




Efektyvumo charakteristikos

„QIAamp® DSP Circulating NA Kit“, 1 versija, **REF** 61504

Versijų valdymas

  	Prieš vykdydami testą, patikrinkite, ar svetainėje www.qiagen.com , ieškant pagal gaminio numerį ir gaminio išteklius, yra naujų pataisytų elektroninio ženklavimo leidimų.
---	--

Bendras įvadas

„QIAamp DSP Circulating NA Kit“ yra sistema, kuri naudodama silicio dioksido membranos technologiją („QIAamp“ technologiją) atskiria ir išgrynina cirkuliuojančią neląstelinę (ccf) DNR ir RNR iš žmogaus kraujo plazmos mėginių.

Šis gaminytis skirtas naudoti tik specialistams, pavyzdžiui, technikams ir gydytojams, susipažinusiems su molekulinės biologijos metodais.

„QIAamp DSP Circulating NA Kit“ yra skirtas tik in vitro diagnostikai.

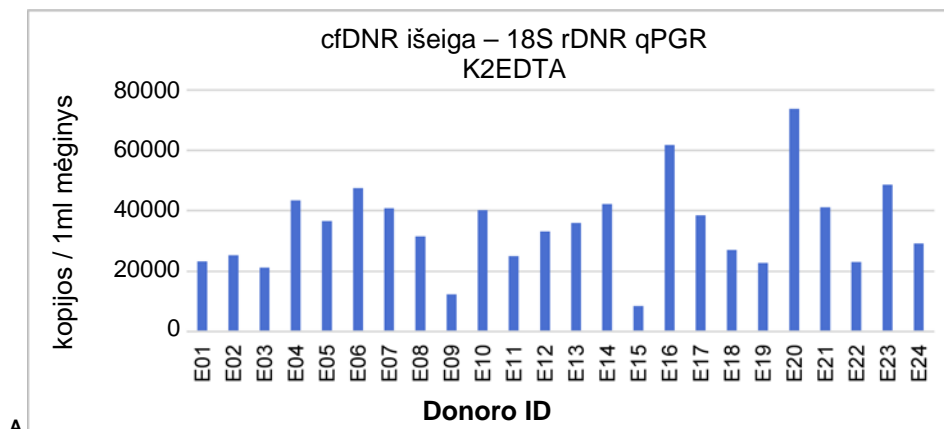
Išgrynintų nukleorūgščių (NR) išeiga

Plazmos mėginiuose gali susidaryti didelės išgrynintų nukleorūgščių išeigos variacijos. Todėl naudotojai savo laboratorijose turėtų optimizuoti plazmos įvestį ir eliuavimo tūrį konkrečiam taikiniui bei pasrovinio pritaikymo procedūroms.

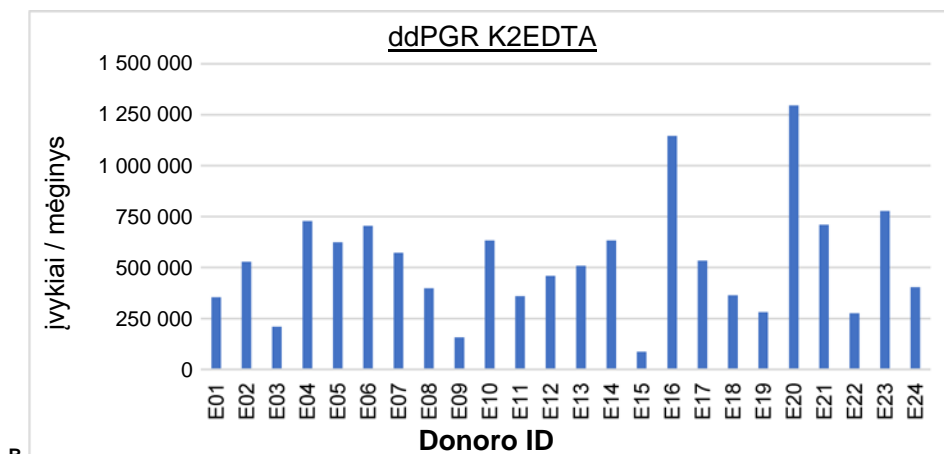
Jei rinkinys naudojamas kartu su „QIAGEN®“ pasrovinio pritaikymo procedūromis, vadovaukitės atitinkamame vadove pateiktomis instrukcijomis.

Pasrovinio pritaikymo procedūrų analizė

Nukleorūgštys, atskirtos naudojant „QIAamp DSP Circulating NA Kit“, yra paruoštos naudoti įvairiose pasrovinio pritaikymo procedūrose. Siekiant įvertinti efektyvumą, nukleorūgštys buvo atskirtos nuo vieno donoro žmogaus kraujo plazmos naudojant tris skirtingus kraujo surinkimo mėgintuvėlius („BD Vacutainer® K2EDTA Tube“, „Becton Dickinson®“, „PAXgene® Blood ccfDNA Tube“, „PreAnalytiX“ ir „Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®“, „Streck“; n=24 donorai kiekvienam mėgintuvėliui). Eliuatai iš mėginių su 1 ml plazmos įvestimi buvo tiriami dėl RNR (tik „BD Vacutainer K2EDTA Tube“ mėgintuvėlio plazmoje, 2 pav.) naudojant kiekybinio nustatymo PGR (qPGR, 1A pav.), lašelinį skaitmeninį PGR (ddPGR, 1B pav.) bei atvirkštinės transkripcijos qPGR (RT-qPGR).

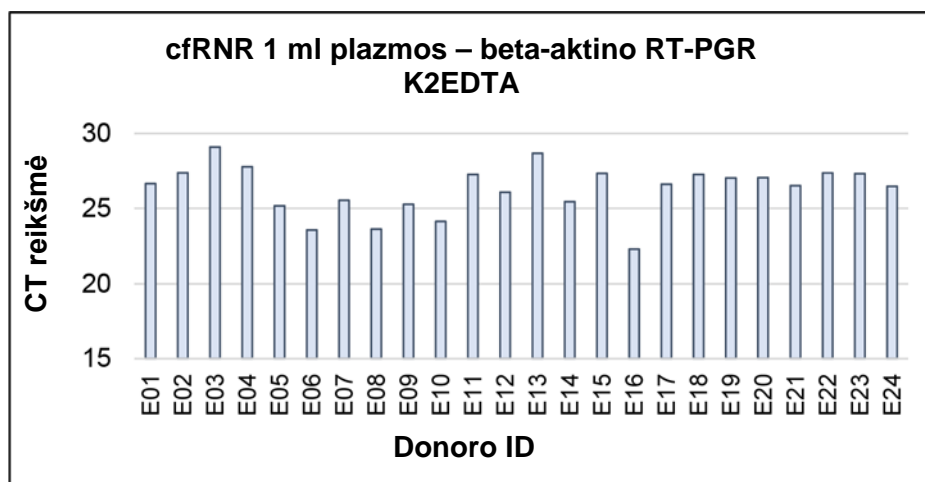


A



B

1 pav. Vieno donoro plazmos qPGR ir ddPGR („Bio-Rad®“) palyginimas (1 ml įvestis)



2 pav. Neląstelinės RNR aptikimas vieno donoro plazmoje (1 ml įvestis), naudojant atvirkštinės transkripcijos qPGR tyrimą žmogaus beta-aktino genui (293 bp fragmento ilgis).

Naujos kartos sekoskaitos (angl. „Next-Generation Sequencing“, NGS) analizės atveju buvo sugeneruoti eliuatai iš mėginių su 5 ml tūrio plazmos įvestimi („BD Vacutainer K2EDTA Tube“, „PAXgene Blood ccfDNA Tube“ ir „Streck Cell-Free DNA BCT“; n=8 donorai kiekvienam mėgintuvėliui). Bendroji 5 ml plazmos DNR išeiga svyravo nuo 50 iki 150 ng DNR, aptiktos naudojant „Qubit® HS dsDNA“ tyrimą. NGS analizė buvo atlikta naudojant „GeneRead®“ „QIAact Actionable Insights Tumor Panel“ ir „GeneReader™“ sistemą. Visi mėginiai buvo sėkmingai pagausinti, taip pat buvo sugeneruotos bibliotekos. >98 % sugeneruotų rodmenų buvo susieti su žmogaus genomu, o >99,8 % pozicijų dominančiuose regionuose bazinė aprėptis buvo ≥500x.

Abiejų nukleorūgščių rūšių (DNR ir RNR) atveju buvo sėkmingai pritaikyta pasrovinė technologija (3 pav.)

	qPGR	ddPGR	RT-qPGR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
„PAXgene“	✓	✓	netirtas	✓
„Streck“	✓	✓	netirtas	✓

3 pav. Sėkmingas atskirtų nukleorūgščių naudojimas su įvairiomis pasrovinio pritaikymo procedūromis.

Naudotojas turi optimizuoti plazmos įvestį ir eliuavimo tūrį tikslinei molekulei ir visoms toliau laboratorijoje atliekamoms procedūroms arba vadovautis konkrečiomis atitinkamo pasrovinio pritaikymo procedūromis.

Eliuato stabilumas

Eliuato stabilumas priklausys nuo atskirtos nukleorūgšties turinio ir tipo, eliuavimo tūrio bei laikymo sąlygų. Naudotojams rekomenduojame nustatyti eliuato stabilumą pagal jų konkrečius poreikius.

Buvo atlikti eliuato stabilumo tyrimai dėl DNR ir eliatų, gautų iš žmogaus plazmos, sugeneruotos naudojant „BD Vacutainer K2EDTA Tube“ mėgintuvėlį („Becton Dickinson“) ir stabilizuojančius kraujo surinkimo mėgintuvėlius („PAXgene Blood ccfDNA Tube“ ir „Streck Cell-Free DNA BCT“). Eliuatai buvo laikomi temperatūroje nuo –30 iki –15 °C ir nuo –90 iki –65 °C. Nebuvo pastebėta jokio jų būklės pablogėjimo iki 12 mėnesių. Eliuatai, laikyti temperatūroje nuo 2 iki 8 °C ir kambario temperatūroje (nuo 15 iki 25 °C), buvo stabilūs iki 48 val. Visos sąlygos buvo įvertintos naudojant qPGR, nukreiptą į žmogaus 18S rDNR geną.

Buvo atlikti eliuato stabilumo tyrimai dėl RNR ir eliatų, gautų iš žmogaus plazmos, sugeneruotos naudojant „BD Vacutainer K2EDTA Tubes“ mėgintuvėlius („Becton Dickinson“). Eliuatai buvo laikomi temperatūroje nuo –30 iki –15 °C ir nuo –90 iki –65 °C. Nebuvo pastebėta jokio jų būklės pablogėjimo iki 6 mėnesių. Eliuatai, laikyti temperatūroje nuo 2 iki 8 °C, buvo stabilūs iki 48 val. Visos sąlygos buvo įvertintos naudojant RT-qPGR, nukreiptą į žmogaus beta-aktino geną.

Jei rinkinys naudojamas kartu su „QIAGEN“ pasrovinio pritaikymo procedūromis, vadovaukitės atitinkamo rinkinio vadovo instrukcijomis.

NR atskyrimo tikslumas

Tikslumas buvo įvertintas naudojant žmogaus plazmą, o sąlygos buvo įvertintos naudojant qPGR, nukreiptą į žmogaus 18S rDNR geną.

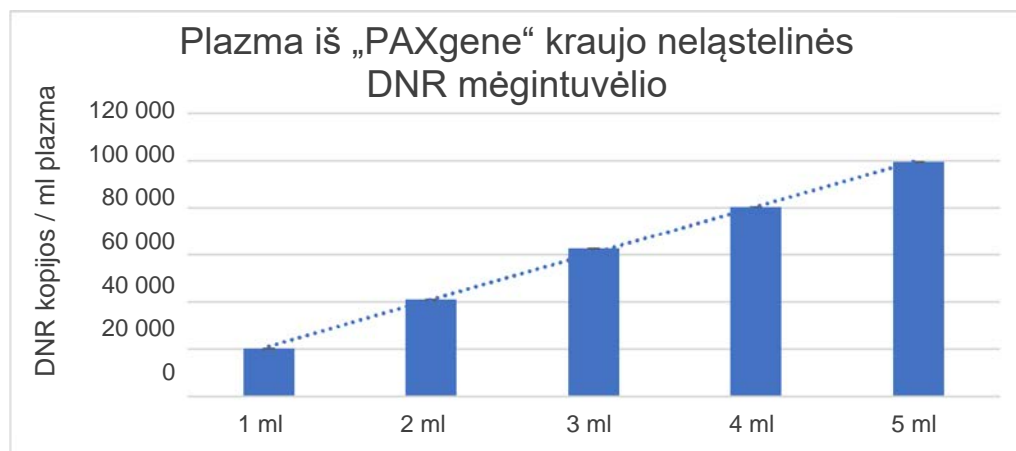
Eksperimentinį tyrimą sudarė 12 gryninimo procedūrų su 12 pakartojimų (viso 144 gryninimai). Gryninimo procedūras atliko trys skirtingi operatoriai per tris skirtingas dienas, naudojant tris skirtingus instrumentus ir tris skirtingas „QIAamp DSP Circulating NA Kit“ partijas. Standartinis nuokrypis (SN) ir variacijos koeficientas (VK) buvo nustatyti kiekvienam atskiram parametrai ir bendram „QIAamp DSP Circulating NA Kit“ rinkinio kintamumui (iš viso) (1 lentelė).

1 lentelė. Tikslumo rezultatai

Tikslumas			
Parametras	Vidurkių kopijos / ml	SN	VK (%)
Kiekvienas tyrimas	25894	461	1,78
Kiekvienas operatorius		1392	5,38
Kiekvienas instrumentas		228	0,88
Kiekviena diena		2096	8,09
Kiekviena partija		969	3,74
Iš viso		3120	12,05

Tiesiškumas

Duomenys buvo sugeneruoti iš mėginių su 1–5 ml tūrio plazmos įvestimis, naudojant kraują laikomą „BD Vacutainer K2EDTA Tubes“, „PAXgene Blood ccfDNA Tubes“ ir „Streck Cell-Free DNA BCT“. Visuose kraujo surinkimo mėgintuvėliuose buvo nustatytas tiesinis DNR išeigos padidėjimas (žr. 4 pav.); taip pat buvo ir RNR atveju „BD Vacutainer K2EDTA Tubes“ mėgintuvėliuose.



4 pav. Tiesinis bendros DNR išeigos padidėjimas (DNR kopijos / ml plazmos įvestis) pagal skirtingus plazmos įvesties tūrius. Pavaizduoti plazmos, sugeneruotos iš „PAXgene Blood ccfDNA Tube“ mėgintuvėlio, duomenys ir atitinkami plazmos, gautos iš „BD Vacutainer K2EDTA Tube“ (DNR / RNR) ir „Streck Cell-Free DNA BCT“ neląstelinės DNR kraujo surinkimo mėgintuvėlių, rezultatai.

Protokolo lygiavertiškumas (supaprastintasis / klasikinis protokolai)

Buvo nustatytas supaprastintojo ir klasikinio protokolų efektyvumo lygiavertiškumas parodant, kad atitinkama skirtumų tarp Ct reikšmės vidurkio (RNR) arba vidurkio kopijų / ml (DNR) 95 % patikimumo riba buvo $\pm 2 \times SD$ intervale, kai SD yra nustatytas klasikinio protokolo tikslumas (etaloninė sąlyga). Buvo panaudotos trys rinkinių partijos, o eksperimentus atliko trys operatoriai.

Supaprastintojo protokolo atveju sugeneruotų Ct reikšmių bendrasis tikslumas (SD) buvo mažesnis nei bendrojo tikslumo (SD) dvipusio 95 % prognozuojamo intervalo viršutinė riba klasikinio protokolo atveju, kai prognozuojamas intervalas tyrimo metu buvo apskaičiuotas naudojant duomenis iš klasikinio protokolo (n=143) ir naudojant kelis duomenų taškus supaprastintajam protokolui (n=144).

Trukdančios medžiagos

Trukdančios medžiagos gali atsirasti iš įvairių šaltinių, pvz., natūralių metabolitų, pacientų gydymo metu patekusių medžiagų arba paciento nurytų medžiagų. „QIAamp DSP Circulating NA Kit“ rinkinio atveju hemoglobinas, trigliceridai, EDTA, kofeinas, albuminas, konjuguotas bilirubinas ir nekonjuguotas bilirubinas buvo ištirti kaip endogeniniai komponentai. Taikant qPCR kaip pasrovinio pritaikymo procedūrą trukdžių nebuvo aptikta. Be to, mėginių apdorojimo ir nukleorūgšties ekstrahavimo metu nebuvo nustatyta jokių trukdžių, kuriuos galėtų sukelti „QIAamp DSP Circulating NA Kit“ rinkinio komponentai (proteinazė K, „Buffer ACL“, „Buffer ACB“, „Buffer ACW1“, „Buffer ACW2“ ir etanolis).

Dėl potencialių trukdančių medžiagų kompleksiško ir įvairaus konkrečių pasrovinio pritaikymo procedūrų jautrumo naudotojams rekomenduojame įvertinti trukdančių medžiagų poveikį pagal konkrečių jų darbo eigą ir pasitvirtinti trukdžių valdymo metodą atliekant konkrečias diagnostines pasrovinio pritaikymo procedūras.

Daugiau informacijos apie trukdančias medžiagas atliekant konkrečias „QIAGEN®“ pasrovinio pritaikymo procedūras pateikta atitinkamų rinkinių vadovuose.

Kryžminė tarša

Siekiant įvertinti kryžminės taršos lygį, į mėginius su 5 ml arba 2 ml tūrio plazma (teigiamus mėginius) buvo įmaišyta 10^5 HBV viruso kopijų ir jie buvo izoliuoti greta mėginių be viruso (neigiamų mėginių) bei išdėstyti šachmatų tvarka, pakaitomis atliekant ekstrahavimo procedūras tik su neigiamais mėginiais (siekiant įvertinti kryžminę taršą partijų viduje ir tarp partijų). Tyrimu buvo siekiama imituoti situaciją, kai mėginiai, kuriuose yra daug nukleorūgšties tikslinių molekulių, gali kryžmini būdu užteršti kitus mėginius atliekant ekstrahavimo procedūrą. NR gryninimas buvo atliktas naudojant vieną reagentų partiją. Kryžminė tarša buvo įvertinta naudojant „artus® HBV RG CE PCR Kit“ rinkinį. Rezultatai neparodė jokios kryžminės taršos visoje sistemoje.

Pastabos

Peržiūros istorija

Data	Keitimai
R1 09/2019	Pradinis leidimas
R2 08/2021	Peržiūrėtos mėginių, skirtų eliuato stabilumo tyrimams dėl DNR, laikymo sąlygos: galima laikyti nuo –30 iki –15 °C ir nuo –90 iki –65 °C temperatūroje iki 12 mėn. Peržiūrėtos mėginių, skirtų eliuato stabilumo tyrimams dėl RNR, laikymo sąlygos: galima laikyti nuo –30 iki –15 °C ir nuo –90 iki –65 °C temperatūroje iki 6 mėn. Ištaisyta klaida efektyvumo lape: RNR laikymas nebuvo išbandytas kambario temperatūroje (15–25 °C). Ištaisyti tyrimo tikslumo duomenys SN ir VK stulpeliuose, 1 lentelėje.

Naujausia informacija apie licencijavimą ir tam tikrų gaminių garantinių įsipareigojimų ribojimą pateikta atitinkamame QIAGEN rinkinio vadove arba naudotojo vadove. QIAGEN rinkinių vadovai ir naudotojo vadovai pateikiami svetainėje www.qiagen.com arba galite jų paprašyti QIAGEN techninės priežiūros skyriaus ar vietinio platintojo.

Prekių ženklai: „QIAGEN“, „Sample to Insight“, „QIAamp“, „artus“, „GeneRead“, „GeneReader™“ (QIAGEN Group); „BD Vacutainer“, „Becton Dickinson“, „Becton Dickinson and Co.“; „Bio-Rad“, „Bio-Rad Laboratories, Inc.“; „PAXgene“, „PreAnalytix GmbH“; „Streck“, „Cell-Free DNA BCT“, „Streck Inc.“; „Qubit“, „Thermo Fisher Scientific“ arba jos dukterinės įmonės.

HB-0466-D01-002 © 2021 QIAGEN. Visos teisės saugomos.

