

QIAsymphony® DSP Circulating DNA Kit

Gebruiksaanwijzing (Prestatiekenmerken)

Versie 2



Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Voor gebruik met QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Duitsland

R1

De prestatiekenmerken zijn in elektronische vorm beschikbaar. U kunt deze vinden onder het tabblad 'Resources' (Hulpmiddelen) van de productpagina op www.qiagen.com.

Algemene inleiding

Het QIASymphony DSP Circulating DNA-systeem vormt een gebruiksklaar in-vitro-systeem voor de kwalitatieve zuivering van circulerend celvrij DNA (ccfDNA) uit humaan plasma en urine.

De QIASymphony DSP Circulating DNA Kit is uitsluitend bedoeld voor gebruik in combinatie met het QIASymphony SP-apparaat.

De QIASymphony DSP Circulating DNA Kit bevat reagentia voor volledig geautomatiseerde en gelijktijdige zuivering van menselijk ccfDNA uit een breed scala aan humaan plasma en urine (met ccfDNA-profielstabilisatoren, bijvoorbeeld Cell-Free DNA BCT® van Streck® en zonder ccfDNA-profielstabilisatoren, bijvoorbeeld EDTA-buisjes) en menselijke urine (met en zonder ccfDNA-profielstabilisatoren). Er is echter geen prestatiekenmerk voor elk mogelijk bloedafnamebuisje vastgesteld, en dit moet door de gebruiker worden gevalideerd.

Het gezuiverde ccfDNA is compatibel met een breed scala aan latere toepassingen, zoals PCR-chemie, fluorescentie gebaseerde kwantificeringsanalyses of NGS.

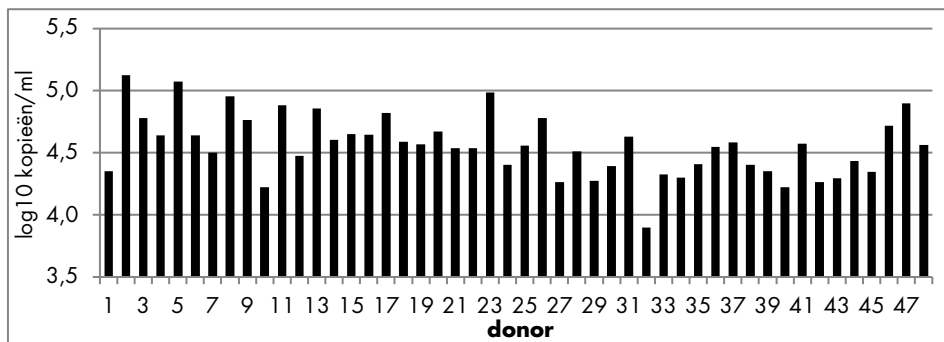
De QIASymphony SP voert alle stappen van de zuiveringsprocedure uit. In één run kunnen maximaal 96 monsters, in partijen van 24, worden verwerkt. Het kan nodig zijn om urinemonsters handmatig voor te behandelen.

Opmerking: De prestatiekenmerken zijn sterk afhankelijk van verschillende factoren, en houden verband met de specifieke latere toepassing. Deze stabiliteit is voor de QS DSP Circulating DNA Kit vastgesteld in combinatie met typische latere toepassingen. Methoden voor het isoleren van nucleinezuren van biologisch specimen worden echter gebruikt als startpunt voor meerdere latere toepassingen. De prestatieparameters, bijvoorbeeld kruisbesmetting en nauwkeurigheid van runs moeten voor dergelijke latere toepassingen worden bepaald als onderdeel van de ontwikkeling van de latere toepassing. Daarom is het de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de gehele workflow te valideren om de juiste prestatieparameters vast te stellen.

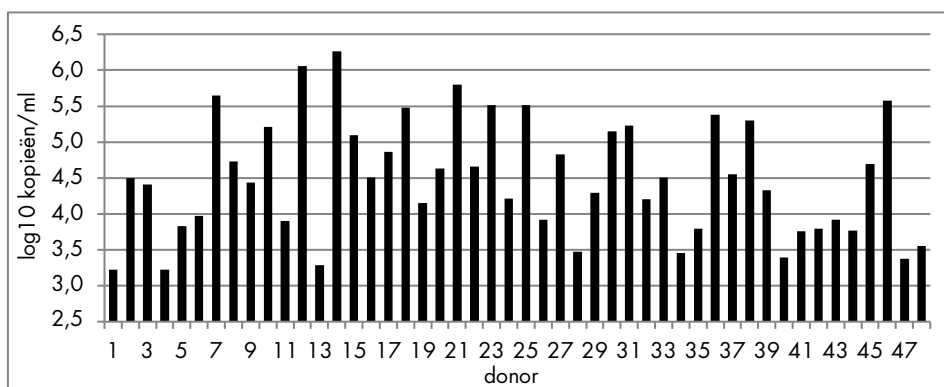
Basiswerking

De basisprestaties van de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit werden beoordeeld met behulp van 48 afzonderlijke donoren voor extractie van ccfDNA uit 4 ml Streck-plasma en 4 ml gestabiliseerde urine. De ccfDNA-opbrengst werd vastgesteld met een intern real-time PCR-assay voor de 18S ribosomale DNA-sequentie.

Het verschil in opbrengsten (log₁₀ kopieën/ml) in Afbeelding 1 (4 ml plasma) en Afbeelding 2 (4 ml urine) weerspiegelt de sterke mate waarin concentraties ccfDNA die gewoonlijk in hetzelfde volume van betreffende monstermateriaal worden gevonden afhankelijk zijn van de donor.



Afbeelding 1. De ccfDNA-opbrengst uit plasma van 48 afzonderlijke donoren. Bloeddonatie van 48 afzonderlijke donoren werd gedaan in Cell-Free DNA BCT (Streck). CcfDNA werd geëxtraheerd uit 4 ml plasma met behulp van de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. De ccfDNA-opbrengst werd gekwantificeerd met behulp van een intern real-time PCR-assay voor de 18S-sequentie. De resultaten werden berekend als doelkopieën per milliliter plasma-invoer.



Afbeelding 2. De ccfDNA-opbrengst uit urine van 48 afzonderlijke donoren. Van 48 afzonderlijke donoren verzamelde urine werd gestabiliseerd met behulp van Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck). CcfDNA werd geëxtraheerd uit 4 ml urine met behulp van de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. De ccfDNA-opbrengst werd gekwantificeerd met behulp van een intern real-time PCR-assay voor de 18S-sequentie. De resultaten werden berekend als doelkopieën per milliliter urine-invoer.

Nauwkeurigheid van de run

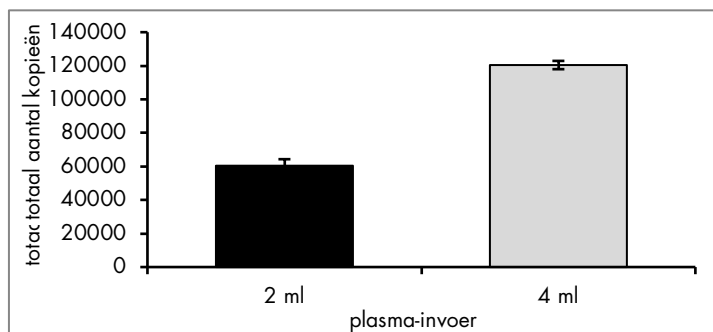
Variatiecoëfficiënten (VC's) werden bepaald voor de extractie van humaan ccfDNA uit EDTA-plasma. Voor analyse van de nauwkeurigheid werd ccfDNA gekwantificeerd met een real-time PCR-assay van het eigen laboratorium, op basis van de coderende sequentie van 18S-ribosomaal RNA. In totaal werden 10 QIASymphony-runs in 4 batches per run uitgevoerd (8 replicaten per batch). De nauwkeurigheidsgegevens zijn vermeld in tabel 1.

Tabel 1. Analyse van schattingen van de nauwkeurigheid

Nauwkeurigheid	CV (%)
Binnen batch	11,67
Reproduceerbaarheid	13,14
Intermediaire nauwkeurigheid	13,14
Totale nauwkeurigheid	14,12

Equivalente prestaties tussen 2 ml- en 4 ml-protocollen

Equivalente prestaties van protocollen voor 2 en 4 ml monsterinvoer werd voor de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit beoordeeld met gebruik van endogene ccfDNA die werd geëxtraheerd uit een EDTA-pool van humaan plasma. In totaal werden 8 onafhankelijke QIASymphony-runs in 4 batches per run uitgevoerd met 8 replicaten per batch. Het lineaire bereik van de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit-procedure is bepaald voor de 18S-sequentie met gebruik van een interne real-time PCR assay (Afbeelding 3). De verhouding van het verschil tussen de 2 ml- en 4ml-protocollen wordt weergegeven in Tabel 2 (Het referentieprotocol is 4ml monsterinvoer).



Afbeelding 3. Equivalente prestaties met gebruik van de protocollen voor 2 ml en 4 ml monsterinvoer. Het ccfDNA-protocol werd bepaald met behulp van de protocollen voor 2 ml en 4 ml. De opbrengst aan ccfDNA werd gekwantificeerd met een real-time PCR-assay van het eigen laboratorium, op basis van de coderende sequentie van 18S-rRNA. De resultaten werden berekend als totaal aantal kopieën per protocol.

Tabel 2. Verschil tussen 2 ml- en 4 ml-protocollen (N = 256)

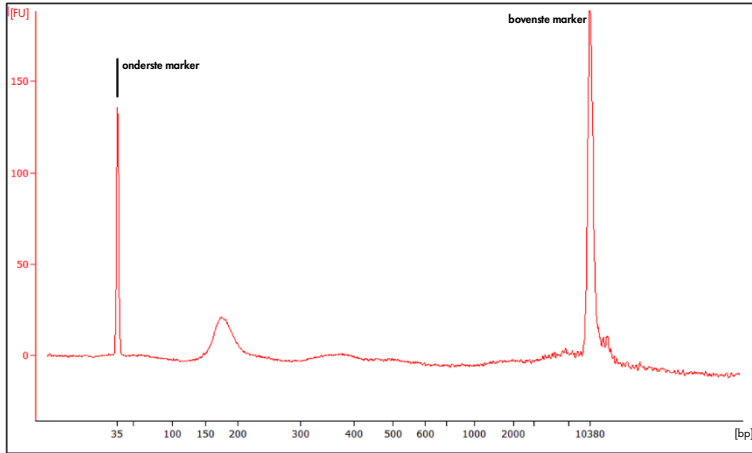
Parameter	Waarde
Geschatte ratio van het geometrische gemiddelde in het berekende aantal kopieën/ml	1,01
Onderste 95% betrouwbaarheidslimiet	0,92
Bovenste 95% betrouwbaarheidslimiet	1,11
Totale nauwkeurigheid	14,12

De prestaties van protocollen voor 2 ml en 4 ml monsterinvoer zijn gemeten in berekende kopieën per milliliter equivalent.

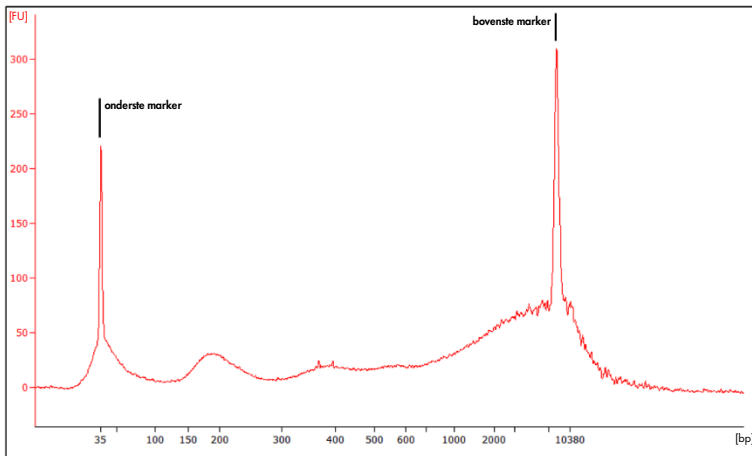
Lengteverdeling

Om de verdeling van de hoeveelheid monsterinvoer te beoordelen, werd met behulp van de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, ccfDNA geëxtraheerd uit een monsterinvoer van 4 ml, geëluëerd in 75 µl, en vervolgens werd de 1 µl eluaat onderworpen aan een analyse van de hoeveelheid, met gebruik van de Agilent® 2100 Bioanalyzer met een Agilent High Sensitivity DNA Chip. In totaal werden 5 onafhankelijke replica's uitgevoerd. In [Afbeelding 4](#) wordt een representatief DNA-profiel voor plasma getoond, en in [Afbeelding 5](#) een representatief DNA-profiel voor urine.

Het elektroferogram voor plasma in [Afbeelding 4](#) laat zien dat de piek vaak waargenomen werd bij ongeveer 165 bp, variërend van 145 tot 196 bp, wat binnen het bereik is van de lengte van het histon-gebonden DNA in de nucleosoos. Het elektroferogram voor urine in [Afbeelding 5](#) laat zien dat de belangrijkste piek bij ongeveer 160 bp breder is, en varieert van ongeveer 145 tot 250 bp. Daarnaast is er voor urine een tweede piek aanwezig, van ongeveer 20 tot 100 bp (op het niveau van de onderste markerpiek), wat duidt op een ccfDNA-fractie met een hogere mate van fragmentatie. Bovendien laat [Afbeelding 5](#) een groot aantal lange fragmenten van ongeveer 2 kb zien. In urinemonsters wordt vaak een grote overmaat aan zulke genomische DNA-fragmenten gevonden, hoogstwaarschijnlijk doordat genomisch DNA vrijkomt uit in de urine aanwezige cellen.



Afbeelding 4. Lengteverdeling van cfDNA uit plasma (Bioanalyzer-profiel). Het cfDNA werd met behulp van de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit geëxtraheerd uit 4 ml EDTA-plasma; 1 µl eluaat werd onderworpen aan een Agilent High Sensitivity DNA Chip-analyse. x-as: aantal basenparen (bp); y-as: fluorescentie-eenheden (Fluorescence Unit, FU).

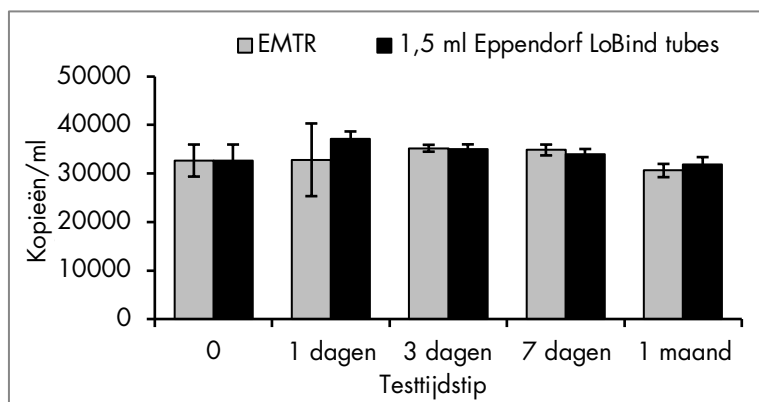


Afbeelding 5. Lengteverdeling van cfDNA uit urine (Bioanalyzer-profiel). Het cfDNA werd met behulp van de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit geëxtraheerd uit 4 ml urine; 1 µl eluaat werd onderworpen aan een Agilent High Sensitivity DNA Chip-analyse. x-as: aantal basenparen (bp); y-as: fluorescentie-eenheden (Fluorescence Unit, FU).

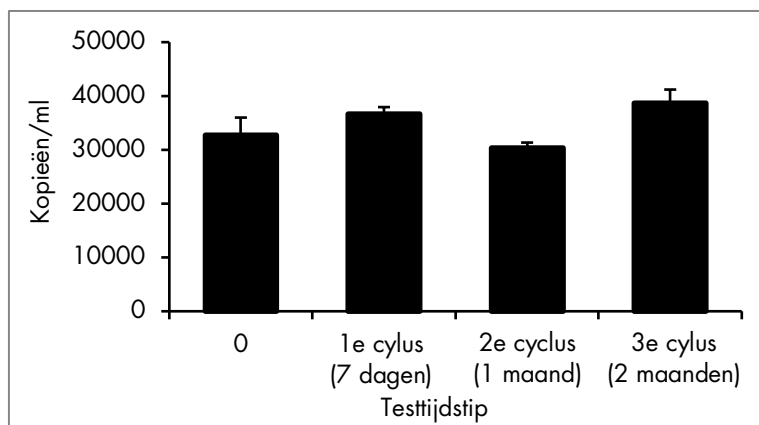
Stabiliteit van het eluaat

De stabiliteit van het eluaat voor de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit werd beoordeeld met behulp van geëxtraheerd ccfDNA uit een humane EDTA-plasmagroep. Eluaten werden bewaard in elutierekken met 2 verschillende formaten: QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; catalogusnummer 19588) en 1,5 ml Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock tubes. Eluaten werden geanalyseerd in replicaties van 8. De stabiliteit van DNA in eluaten werd bepaald met een real-time PCR-assay van het eigen laboratorium, op basis van de coderende sequentie van 18S-ribosomaal RNA.

De stabiliteit van eluaat bij 2-8 °C werd niet beïnvloed door opslag met een duur van maximaal een maand, of door de wijze van opslag (Afbeelding 6). De stabiliteit van DNA in LoBind-buisjes werd niet beïnvloed door opslag bij -15 °C tot -30 °C met 3 cycli van bevriezen-ontdooien na 7 dagen, één maand en twee maanden (Afbeelding 7).



Afbeelding 6. Stabiliteit van ccfDNA in eluaten die zijn bewaard bij 2-8 °C in 2 buizenformaten. Het ccfDNA werd geëxtraheerd uit EDTA-plasma met de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit en bewaard bij 2-8 °C voor verschillende testtijdstippen. De opbrengst aan ccfDNA werd gekwantificeerd met een real-time PCR-assay van het eigen laboratorium, op basis van de coderende sequentie van 18S-rRNA. De resultaten werden berekend als doelkopieën per milliliter plasma-invoer.



Afbeelding 7. Stabiliteit van ccfDNA in eluaten die opgeslagen bij -15 °C tot -30 °C met 3 cycli van bevriezen-ontdooien. Het ccfDNA met behulp van de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit geëxtraheerd uit EDTA-plasma en opgeslagen bij -15 °C tot -30 °C in 1,5 ml Eppendorf LoBind Tubes. De opbrengst aan ccfDNA werd bepaald op 3 testtijdstippen met gebruik van hetzelfde eluaat bij 3 cycli van bevriezen-ontdooien. De opbrengst aan ccfDNA werd gekwantificeerd met een real-time PCR-assay van het eigen laboratorium, op basis van de coderende sequentie van 18S-rRNA. De resultaten werden berekend als doelkopieën per milliliter plasma-invoer.

Stoffen met een versturende werking

Humaan plasma en urine werden verrijkt met verschillende potentieel versturende stoffen (zie Tabel 3) om hun effect op de ccfDNA-extractieprestaties van de QS DSP Circulating DNA Kit en de navolgende compatibiliteit met typische latere toepassingen te testen. Eluaten werden geanalyseerd met een intern real-time PCR assay voor de 18S-sequentie, en met de Qubit® Fluorometer met gebruik van een High Sensitivity dsDNA-assay.

Tabel 3. Testconcentraties van stoffen met een potentieel versturende werking

Stoffen met een versturende werking	Plasma	Urine
Bilirubine	200 mg/liter*	200 mg/liter*
Hemoglobine	2 g/liter ¹	-
BSA en gammaglobuline	Maximaal 120 g/liter*	1 g/liter [†]
Triglyceriden	5 g/liter*	-
Glucose	10 g/liter*	10 g/liter*
Bloed	-	1% [†]
pH	-	pH 4 en pH 9 [†]

* CLSI EP7-A2 Vol. 25 Nr. 27

[†] FDA Draft Guidance (11.05.2011)

Geen van de in Tabel 3 vermelde stoffen zijn versturend, behalve plasmamonsters met hoge concentraties gammaglobuline (>30 g/liter), die kunnen leiden tot een verminderde opbrengst van circulerend celvrij DNA.

Opmerking: De testen werden uitgevoerd met behulp van typische latere toepassingen, waarbij de kwaliteit van de geëxtraheerde nucleïnezuuren werd beoordeeld. Verschillende latere toepassingen kunnen echter verschillende eisen met betrekking tot zuiverheid hebben (d.w.z. afwezigheid van potentieel versturende stoffen), zodat het bepalen en testen van relevante stoffen ook plaats moet vinden als onderdeel van de ontwikkeling van latere stoffen voor elke workflow waarvoor de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit gebruikt wordt.

Kruisbesmetting

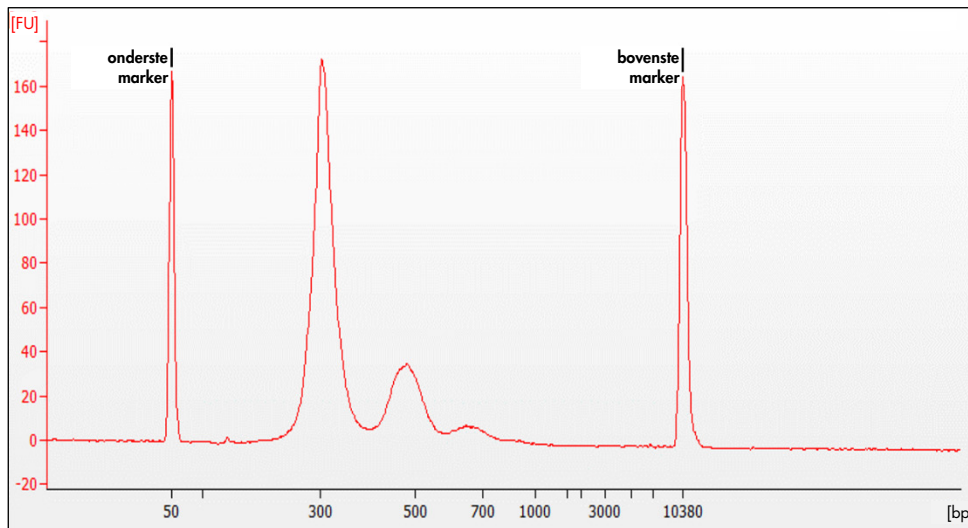
Het risico op kruisbesmetting van het QIASymphony DSP Circulating DNA-systeem werd onderzocht door het uitvoeren van 96 monsterruns op het QIASymphony SP-instrument met afwisselende dambordpatronen (afwisselend positieve en negatieve monsters). Vrouwelijk plasma (negatief monster) en vrouwelijk plasma verrijkt met gefragmenteerd mannelijk gDNA met een concentratie van 1,0E+05 kopieën van SRY1-gen per milliliter plasma (positief monster) werden als monstermateriaal voor een modelsysteem gebruikt. De monstervoorbereiding werd uitgevoerd met het 4 ml-protocol, waarbij twee afzonderlijke monsters van elk 2 ml werden overgebracht. Mogelijke besmetting van de negatieve vrouwelijke plasma-monsters tijdens de extractieruns werd beoordeeld door een navolgende analyse van de eluaten met behulp van een real-time PCR voor het specifieke SRY1-gen van het Y-chromosoom.

Er werd geen kruisbesmetting gedetecteerd door carry-over van monster op monster, batch op batch of run op run.

Compatibiliteit met verschillende latere toepassingen

Bij de ontwikkeling van de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit werden typische latere toepassingen gebruikt om aan te tonen dat de geïsoleerde nucleïnezuren compatibel zijn met een breed scala verschillende technologieën voor latere toepassingen, waaronder real-time PCR (zie Afbeelding 1, Afbeelding 2, Afbeelding 3, Afbeelding 6, en Afbeelding 7), Qubit Fluorometer (proteïne-assay en High Sensitivity dsDNA-assay), Bibliotheek (zie Afbeelding 8), en Next Generation Sequencing (NGS).


















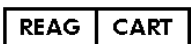
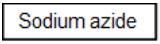
Het elektroferogram in Afbeelding 8 laat een voorbeeld zien van een succesvolle adapter-ligatie en daaropvolgende amplificatie van ccfDNA. Naast de prominente piek bij 300 bp voor het nucleosomaal ccfDNA (ongeveer 165 plus ongeveer 70 bp voor elke adapter), is ook de di-nucleosomale piek bij ongeveer 470 bp te zien.



Afbeelding 8. DNA-bibliotheek van ccfDNA (één donor) geëxtraheerd met de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. Het ccfDNA werd geëxtraheerd uit het Streck-plasma met gebruik van het 4 ml-protocol en vervolgens werd 35 µl eluaat overgebracht naar de NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs). Na amplificatie en AMPure XP reiniging werd 1 µl eluaat geanalyseerd met de Agilent 7500 DNA Kit.

Symbolen

De volgende symbolen worden in de gebruiksaanwijzing of op de verpakking en etiketten weergegeven:

Symbol	Symboldefinitie
	Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties
	Uiterste gebruiksdatum
	Dit product voldoet aan de vereisten van de Europese regelgeving 2017/746 inzake in-vitrodiagnostische medische hulpmiddelen.
	In-vitrodiagnostisch medisch hulpmiddel
	Catalogusnummer
	Partijnummer
	Materiaalnummer (m.b.t. labeling van componenten)
	Bestanddelen
	Bevat
	Nummer
	Global Trade Item Number (Artikelnummer wereldhandel)
Rn	'R' staat voor de revisie van de gebruiksaanwijzing; 'n' is het revisienummer
	Temperatuurbepierking
	Fabrikant
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Waarschuwing/voorzichtig
	Proteïnase K
	Wellnummer (d.w.z. reagenscartridge-well)
	Reagenscartridge
	Natriumazide

Symbool

Symbooldefinitie

EtOH

Ethanol

UDI

Uniek hulpmiddel-identificatienummer

Revisiegeschiedenis

Revisie	Beschrijving
R1, juni 2022	Versie 2, revisie 1 <ul style="list-style-type: none">• Update naar versie 2 voor naleving van IVDR• Paragraaf over Vestorende stoffen, Kruisbesmetting en compatibiliteit met latere toepassingen toegevoegd

Raadpleeg de (gebruikers)handleiding van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische diensten van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®(QIAGEN Group); Cell-Free DNA Urine Preserve®, Cell-Free DNA BCT®, Streck® (Streck); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Eppendorf®, LoBind® (Eppendorf AG); NEBNext® (New England Biolabs, Inc.); Qubit® (Thermo Fisher Scientific of haar dochterondernemingen). De gedeponeerde namen, handelsmerken, etc. die in dit document worden gebruikt, moeten altijd als wettelijk beschermd worden beschouwd, zelfs als ze niet specifiek als zodanig zijn aangegeven.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

