



Juni 2022

Bruksanvisning for QIASymphony® DSP Circulating DNA Kit (ytelsesegenskaper)

Versjon 2

IVD

Til in vitro-diagnostikk

Til bruk sammen med QIASymphony DSP Circulating DNA Kit



REF

937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

R1

Ytelsesegenskaper er tilgjengelige i elektronisk format under fanen resource (ressurser) på produktsiden til www.qiagen.com.

Generell innledning

QIASymphony DSP Circulating DNA-systemet utgjør et bruksklart in vitro-system for kvalitativ rensing av sirkulerende cellefritt DNA (ccfDNA) fra humant plasma og human urin.

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit er beregnet til bruk kun i kombinasjon med QIASymphony SP-instrumentet.

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit tilbyr reagenser for helautomatisert og samtidig rensing av ccfDNA fra et bredt utvalg av humane plasmatyper (med ccfDNA-profilstabilisatorer, f.eks. Cell-Free DNA BCT[®] fra Streck[®], samt uten ccfDNA-profilstabilisatorer, f.eks. EDTA-rør) og human urin (med og uten ccfDNA-profilstabilisatorer). Men en ytelsesegenskap for hvert blodprøvetakingsrør har ikke blitt fastsatt og må valideres av brukeren.

Renset ccfDNA er kompatibelt med en lang rekke nedstrømsanvendelser, f.eks. PCR-kjemikalier, fluorescensbaserte kvantifiseringsanalyser eller NGS.

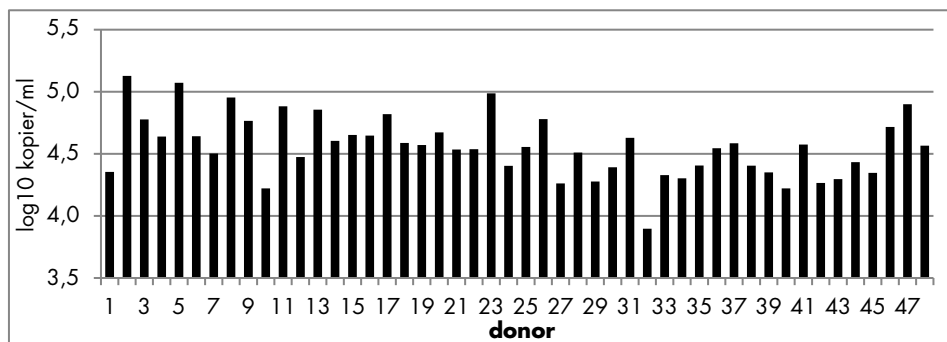
QIASymphony SP utfører alle trinn av rensingsprosedyren. Opptil 96 prøver, i partier på 24, behandles i én enkelt kjøring. Urinprøver kan kreve manuell prøveforbehandling.

Merk: Ytelsesegenskaper avhenger i stor grad av forskjellige faktorer og er knyttet til den spesifikke nedstrømsanvendelsen. Det er etablert for QS DSP Circulating DNA Kit sammen med eksempel på nedstrømsanvendelser. Men metoder for å isolere nukleinsyrer fra biologisk prøve brukes som «front-end» for flere nedstrømsanvendelser. Ytelsesparametere, for eksempel krysskontaminering og kjøringspresisjon, må fastsettes for all slik arbeidsflyt som en del av utviklingen av nedstrøms bruksområder. Det er derfor brukerens ansvar å validere hele arbeidsflyten for å fastslå egnede ytelsesparametere.

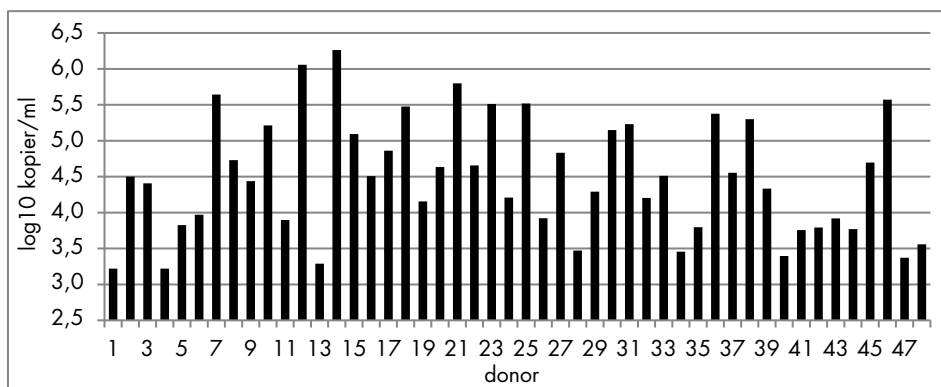
Grunnleggende ytelse

Den grunnleggende ytelsen for QIASymphony DSP Circulating DNA Kit ble evaluert ved hjelp av 48 individuelle donorer for ccfDNA-ekstraksjon fra 4 ml Streck-plasma samt 4 ml stabilisert urin. ccfDNA-utbyttet har blitt bestemt med en intern real-time PCR-analyse for Den 18S ribosomale RNA-kodesekvensen.

Forskjellen i utbytter (log₁₀ kopier/ml) på figur 1 (4 ml plasma) og figur 2 (4 ml urin) gjenspeiler de sterkt donoravhengige konsentrasjonene av ccfDNA som typisk finnes i det samme volumet av respektive prøvemateriale.



Figur 1. ccfDNA-utbyttet fra plasma fra 48 individuelle donorer. Bloddonasjon fra 48 individuelle donorer ble utført i Cell-Free DNA BCT (Streck). CcfDNA ble ekstrahert fra 4 ml plasma ved hjelp av QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. CcfDNA-utbytte ble kvantifisert ved hjelp av en intern real-time PCR-analyse for 18S-kodesekvensen. Resultatene ble beregnet som målkopier per milliliter tilført plasma.



Figur 2. ccfDNA-utbyttet fra urin fra 48 individuelle donorer. Urin samlet inn fra 48 individuelle donorer ble stabilisert ved hjelp av Cell-Free DNA Urin Preserve® (Streck). CcfDNA ble ekstrahert fra 4 ml urin ved hjelp av QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit. CcfDNA-utbytte ble kvantifisert ved hjelp av en intern real-time PCR-analyse for 18S-kodesekvensen. Resultater ble beregnet som målkopier per milliliter tilført urin.

Kjøringspresisjon

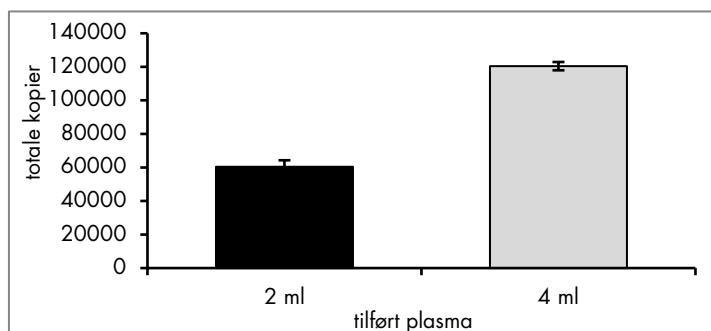
Variasjonskoeffisienter (VK-er) ble bestemt for ekstraksjon av humant ccfDNA fra EDTA-plasma. For presisjonsanalyse ble ccfDNA kvantifisert ved hjelp av en intern real-time PCR-analyse for den 18S ribosomale kodesekvensen. Totalt ble 10 QIAAsymphony-kjøringer utført hver i 4 partier (8 replikater per parti). Presisjonsdataene vises i tabell 1.

Tabell 1. Analyse av presisjonsestimater

Presisjon	VK (%)
Innenfor partier	11,67
Repeterbarhet	13,14
Intermediær presisjon	13,14
Total presisjon	14,12

Tilsvarende ytelse for 2 og 4 ml protokoller

Tilsvarende ytelse for protokoller for 2 og 4 ml tilført prøve ble evaluert for QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit ved hjelp av endogent ccfDNA ekstrahert fra en human EDTA-plasmagruppe. Totalt ble 8 uavhengige QIAAsymphony-kjøringer utført hver i 4 partier med 8 replikater per parti. Det lineære området av QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit-prosedyren har blitt bestemt for 18S-kodesekvensen med en intern real-time PCR-analyse (figur 3). Forskjellsratioen for protokollene på 2 og 4 ml vises i tabell 2 (referanseprotokollen er 4 ml tilført prøve).



Figur 3. Tilsvarende ytelse ved hjelp av 2 og 4 ml prøvetilførselsprotokoll. Det lineære området av ccfDNA-protokollen ble bestemt ved hjelp av protokollene på 2 og 4 ml. CcfDNA-utbyttet ble kvantifisert ved hjelp av en intern real-time PCR-analyse for 18S-kodesekvensen. Resultater ble beregnet som totale kopier per protokoll.

Tabell 2. Forskjell mellom 2 og 4 ml protokoller (N = 256)

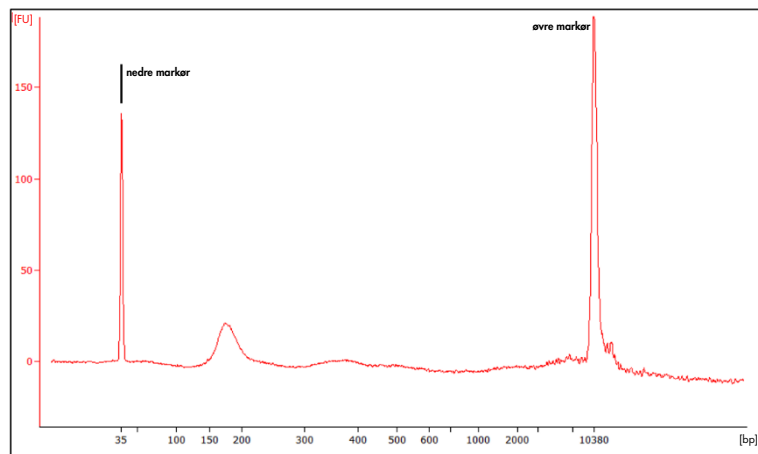
Parameter	Verdi
Beregnet forhold mellom geometriske gjennomsnitt i beregnede kopier/ml	1,01
Nedre 95 % konfidensgrense	0,92
Øvre 95 % konfidensgrense	1,11
Total presisjon	14,12

Ytelsen for protokoller for 2 og 4 ml tilført prøve er tilsvarende, målt i beregnede kopier per milliliter.

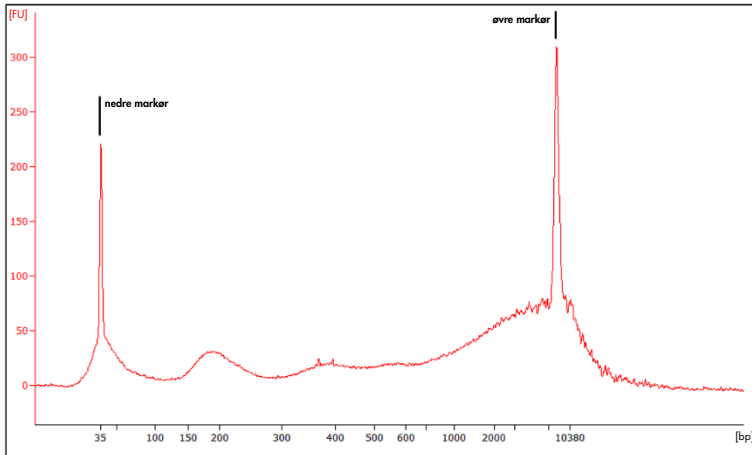
Størrelsesfordeling

For å evaluere størrelsesfordelingen av utmatet prøve ble ccfDNA fra en prøveinnmating på 4 ml ekstrahert ved hjelp av QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, eluert i 75 µl, og deretter ble 1 µl av eluatet utsatt for størrelsesanalyse på Agilent® 2100 Bioanalyzer med en Agilent High Sensitivity DNA Chip. I alt ble det utført 5 uavhengige replikater. Én representativ DNA-profil vises for plasma på figur 4 og for urin på figur 5.

Elektroferogrammet for plasma på figur 4 viser den ofte observerte toppen ved ca. 165 bp, som går fra 145 til 196 bp, og som er i området for lengden av det histonbundne DNA-et i nukleosomet. Elektroferogrammet for urin på figur 5 viser at hovedtoppen ved ca. 160 bp er bredere og går fra ca. 145 til 250 bp. Dessuten er det for urin en andre topp som går fra ca. 20 til 100 bp (ved den nedre markørtoppen), noe som angir en ccfDNA-fraksjon med en høyere grad av fragmentering. Dessuten viser figur 5 et høyt antall lange DNA-fragmenter fra ca. 2 kb. Høyt innhold av slike genomiske DNA-fragmenter er ofte funnet i urinprøver, sannsynligvis på grunn av genomisk DNA-frisetting fra celler som finnes i urin.



Figur 4. Størrelsesfordeling av ccfDNA fra plasma (Bioanalyzer-profil). ccfDNA ble ekstrahert fra 4 ml EDTA-plasma ved hjelp av QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, 1 µl eluat ble utsatt for en Agilent High Sensitivity DNA Chip-analyse. X-akse: baseparstørrelse (bp), y-akse: fluorescensenheter (Fluorescence Units, FU).

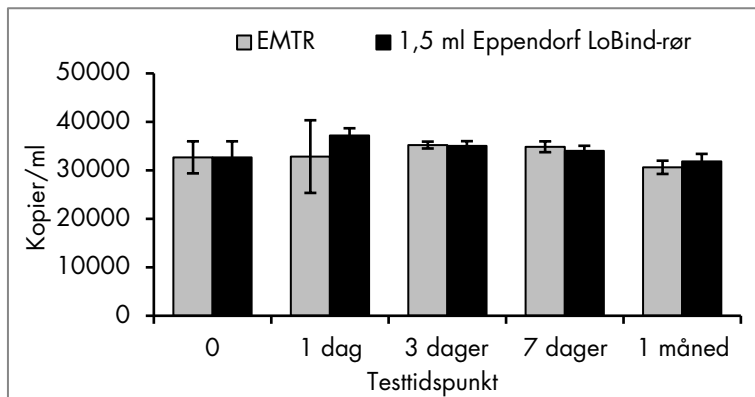


Figur 5. Størrelsesfordeling av ccfDNA fra urin (Bioanalyzer-profil). ccfDNA ble ekstrahert fra 4 ml urin ved hjelp av QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit, 1 µl eluat ble utsatt for en Agilent High Sensitivity DNA Chip-analyse. X-akse: baseparstørrelse (bp), y-akse: fluorescensenheter (Fluorescence Units, FU).

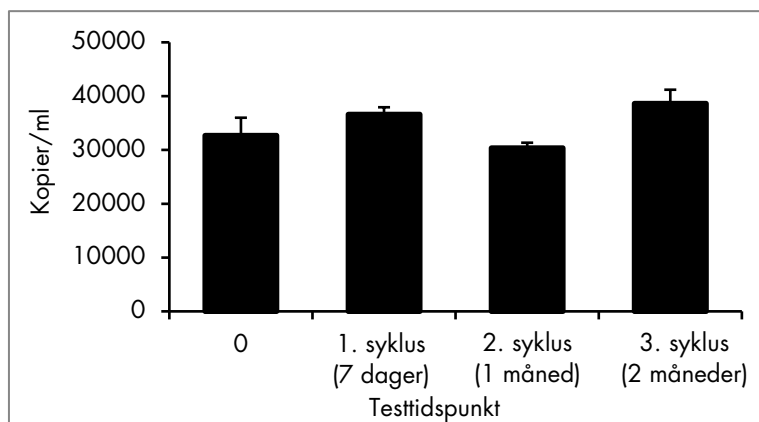
Eluatstabilitet

Eluatstabilitet for QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit ble evaluert ved hjelp av ekstrahert ccfDNA fra en human EDTA-plasmagruppe. Eluater ble oppbevart i 2 forskjellige elusjonsstativformater: QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; kat.nr. 19588) og 1,5 ml Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock tubes. Eluater ble analysert i replikater à 8. Stabiliteten til DNA i eluater ble bestemt med en intern real-time PCR-analyse for den 18S ribosomale RNA-kodesekvensen.

Eluatstabilitet ved 2–8 °C ble ikke påvirket av varigheten på oppbevaringsperioden i opptil én måned, eller av lagringsformat (figur 6). Stabiliteten til DNA i LoBind-rør ble ikke påvirket av oppbevaring ved –15 °C til –30 °C som inkluderte 3 fryse/tine-sykluser etter 7 dager, én måned og to måneder (figur 7).



Figur 6. Stabilitet til ccfDNA i eluater lagret ved 2–8 °C i 2 rørformater. ccfDNA ble ekstrahert fra EDTA-plasma ved hjelp av QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit og oppbevart ved 2–8 °C for forskjellige testtidspunkter. Utbyttet av ccfDNA ble kvantifisert ved hjelp av en intern real-time PCR-analyse for 18S-kodesekvensen. Resultatene ble beregnet som målkopier per milliliter tilført plasma.



Figur 7. Stabilitet til ccfDNA i eluater lagret ved $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, herunder 3 fryse/tine-sykluser. ccfDNA ble ekstrahert fra EDTA-plasma ved hjelp av QIASymphony DSP Circulating DNA Kit og oppbevart ved $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 1,5 ml Eppendorf LoBind-rør. Utbyttet av ccfDNA ble bestemt ved 3 testtidspunkter ved hjelp av det samme eluatet ved 3 fryse/tine-sykluser. Utbyttet av ccfDNA ble kvantifisert ved hjelp av en intern real-time PCR-analyse for 18S-kodesekvensen. Resultatene ble beregnet som målkopier per milliliter tilført plasma.

Interfererende stoffer

Humant plasma og human urin ble tilsatt forskjellige potensielt interfererende stoffer (se tabell 3) for å teste deres påvirkning på ccfDNA-ekstraksjonsytelsen til QS DSP Circulating DNA Kit og etterfølgende kompatibilitet med eksempel på nedstrømsanalyser. Eluater ble analysert med en intern real-time PCR for 18S-kodesekvensen og med Qubit®-fluorometeret ved hjelp av en High Sensitivity dsDNA-analyse.

Tabell 3. Testkonsentrasjoner av potensielt interfererende stoffer

Interfererende stoffer	Plasma	Urin
Bilirubin	200 mg/liter*	200 mg/liter*
Hemoglobin	2 g/liter [†]	–
BSA og Gamma-Globin	Opptil 120 g/liter*	1 g/liter [†]
Triglyserider	5 g/liter*	–
Glukose	10 g/liter*	10 g/liter*
Blod	–	1 % [†]
pH	–	pH 4 og pH 9 [†]

* CLSI EP7-A2 Vol. 25 No. 27

[†] Utkast til FDA-veiledning (11.05.2011)

Ingen av stoffene angitt i tabell 3 er interfererende, unntatt plasmaprøver med høye konsentrasjoner av gamma-globulin (>30 g/liter) som kan føre til redusert gjenfinning av sirkulerende cellefritt DNA.

Merk: Testing ble utført ved hjelp av eksempel på nedstrømsanvendelser for en vurdering av kvaliteten på de ekstraherte nukleinsyrene. Men forskjellige nedstrømsanvendelser kan ha forskjellige krav med hensyn til renhet (dvs. fravær av potensielt interfererende stoffer), så identifiseringen og testingen av relevante stoffer må også fastsettes som en del av utviklingen av nedstrømsanvendelser for alle arbeidsflyter som involverer QIASymphony DSP Circulating DNA kit.

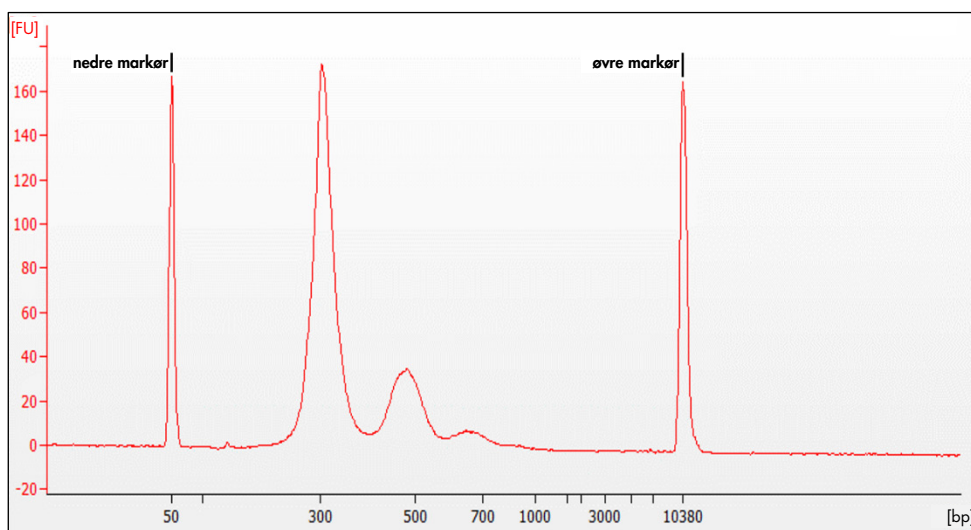
Krysskontaminering

Risikoen for krysskontaminering av QIASymphony DSP Circulating DNA-system ble analysert ved å utføre tre 96 prøvekjøringer på QIASymphony SP-instrumentet med vekslende sjakkruotede partier (positive og negative prøver vekselvis). Kvinnelig plasma (negativ prøve) og kvinnelig plasma tilsatt skåret mannlig gDNA med en konsentrasjon på $1,0E+05$ kopier av SRY1-gen per milliliter plasma (positiv prøve) ble brukt som prøvematerialer for et modellsystem. Prøveklargjøring ble gjort ved hjelp av 4 ml-protokollen, som omfatter to separate prøveoverføringer hver med 2 ml volum. En potensiell kontaminering av de negative kvinnelige plasmaprøvene under ekstraksjonskjøringene ble evaluert ved etterfølgende analyse av eluatene ved hjelp av en real-time PCR for det Y-kromosomspesifikke genet SRY1. Ingen krysskontaminering ble oppdaget for en prøve-til-prøve-, parti-til-parti- eller kjøring-til-kjøring-medrivning.

Kompatibilitet til forskjellige nedstrømsanvendelser

Eksempel på nedstrøms bruksområder ble benyttet under utviklingen av QIASymphony DSP Circulating DNA kit for å vise at de isolerte nukleinsyrene er kompatible med en lang rekke forskjellige nedstrømsanvendelsesteknologier, herunder real-time PCR (se figur 1, figur 2, figur 3, figur 6 og figur 7), Qubit Fluorometer (proteinanalyse og høysensitivets-dsDNA-analyse), bibliotek (se figur 8) og neste generasjons sekvensering (Next Generation Sequencing, NGS).


















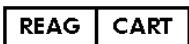
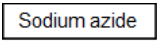
Elektroferogrammet på figur 8 viser et eksempel på en vellykket adapterligering og etterfølgende amplifikasjon av ccfDNA. Ved siden av den tydelige toppen ved 300 bp for det nukleosomale ccfDNA (ca. 165 pluss ca. 70 bp for hver adapter) er også den di-nukleosomale toppen ved ca. 470 bp synlig.



Figur 8. DNA-bibliotek av ccfDNA (individuell donor) ekstrahert med QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. ccfDNA ble ekstrahert fra Streck-plasma ved hjelp av 4 ml-protokollen, og deretter ble 35 μ l eluat overført til NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs). Etter amplifikasjon og AMPure XP cleanup ble 1 μ l eluat analysert med Agilent 7500 DNA Kit.

Symboler

Følgende symboler vises i bruksanvisningen eller på emballasjen og etiketter:

Symbol	Symboldefinisjon
	Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> reaksjoner
	Siste forbruksdato
	Dette produktet oppfyller kravene i den europeiske bestemmelsen 2017/746 for in vitro-diagnostiske medisinske enheter.
	In vitro-diagnostisk medisinsk enhet
	Katalognummer
	Partinummer
	Materialnummer (dvs. komponentmerking)
	Komponenter
	Inneholder
	Nummer
	Globalt artikkelnummer
Rn	R er for revisjon av bruksanvisningen, og n er revisjonsnummeret
	Temperaturbegrensning
	Produsent
	Se bruksanvisningen
	Advarsel/forsiktig
	Proteinase K
	Brønnummer (dvs. reagenskassetbrønn)
	Reagenskasset
	Natriumazid

Symbol

Symboldefinisjon

EtOH

Etanol

UDI

Entydig utstyrsidentifikator

Endringshistorikk

Revisjon	Beskrivelse
R1, juni 2022	Versjon 2, revisjon 1 <ul style="list-style-type: none">• Oppdatering til versjon 2 for samsvar med IVDR• Avsnitt for interfererende stoffer, krysskontaminering og kompatibilitet med nedstrømsanvendelser lagt til

Oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser finnes i håndboken eller brukerhåndboken for det aktuelle QIAGEN-settet. Håndbøker og brukerhåndbøker for QIAGEN-sett er tilgjengelige på www.qiagen.com eller kan fås på forespørsel fra QIAGENS tekniske serviceavdeling eller den lokale distributøren.

Varemerker: 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 eller datterselskaper). Registrerte navn, varemerker osv. som brukes i dette dokumentet, skal ikke betraktes som ubeskyttet av lov, selv om de ikke spesifikt er merket som dette.HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN. Med enerett.

Denne siden skal være tom

