



Juni 2022

Bruksanvisning till QIASymphony[®] DSP Circulating DNA Kit (Prestandaegenskaper)

Version 2



För in vitro-diagnostisk användning
För användning med QIASymphony DSP Circulating DNA Kit



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

R1

Prestandaegenskaperna är tillgängliga elektroniskt och finns på resursfliken på produktsidan på www.qiagen.com.

Allmän introduktion

QIASymphony DSP Circulating DNA-systemet utgör ett in vitro-system som är redo att användas för kvalitativ rening av cirkulerande cellfritt DNA (ccfDNA) från human plasma och urin.

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit är avsett att endast användas i kombination med QIASymphony SP-instrument.

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit tillhandahåller reagenser för helt automatiserad och simultan rening av ccfDNA från ett brett spektrum av humana plasm typer (med ccfDNA-profilstabilisatorer, t.ex. Cell-Free DNA BCT® från Streck® och utan ccfDNA-profilstabilisatorer, t.ex. EDTA-rör) och human urin (med och utan ccfDNA-profilstabilisatorer). Prestandaegenskaperna för varje blodprovtagningrör har emellertid inte fastställts, utan måste valideras av användaren.

Renat ccfDNA är kompatibelt med många olika nedströmstillämpningar, till exempel PCR-kemi, fluorescensbaserade kvantifieringsanalyser eller NGS.

QIASymphony SP utför alla steg i reningsproceduren. I en enda körning behandlas upp till 96 prover i satser om 24. Urinprover kan kräva manuell förbehandling.

OBS! Prestandaegenskaperna beror till stor del på olika faktorer och står i relation till den specifika nedströmstillämpningen. Den har fastställts för QS DSP Circulating DNA Kit tillsammans med exempel på nedströmstillämpningar. Metoder för att isolera nukleinsyror från biologiska prover används dock som inledning till flera nedströmstillämpningar, till exempel behöver prestandaparametrar, korskontaminering och körningsprecision fastställas för sådana arbetsflöden som en del av utvecklingen av nedströmstillämpningen. Därför är det användarens ansvar att validera hela arbetsflödet för att fastställa lämpliga prestandaparametrar.

Grundläggande prestanda

Den grundläggande prestandan hos QIASymphony DSP Circulating DNA Kit utvärderades med hjälp av 48 enskilda givare för ccfDNA-extraktion från 4 ml Streck-plasma liksom 4 ml stabiliserad urin. ccfDNA-utbytet har fastställts med en intern real-time PCR-analys för kodningssekvensen 18S ribosomal RNA.

Skillnaden i utbyte (\log_{10} -kopior/ml) mellan bild 1 (4 ml plasma) och bild 2 (4 ml urin) återspeglar de starkt givarspecifika koncentrationerna av ccfDNA som oftast finns i provvolymen för respektive provmaterial.

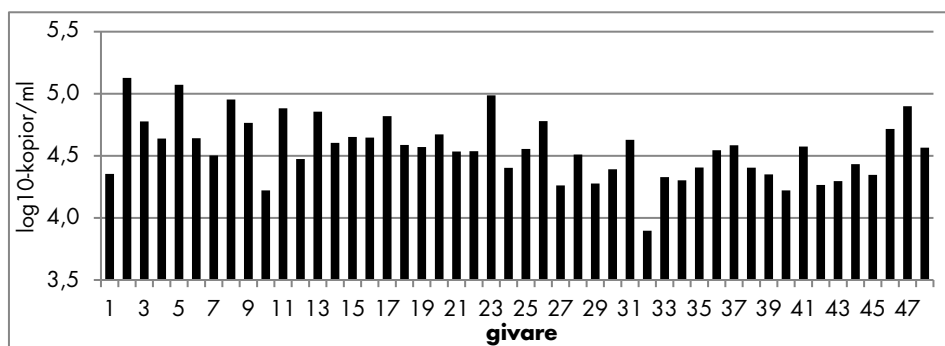


Bild 1. ccfDNA-utbyte av plasma från 48 enskilda givare. Blodgivning från 48 enskilda givare utfördes i Cell-Free DNA BCT (Streck). CcfDNA extraherades från 4 ml plasma med QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. CcfDNA-utbytet kvantifierades med en intern real-time PCR-analys för kodningssekvensen 18S. Resultaten beräknades som målkopior per milliliter plasmainmatning.

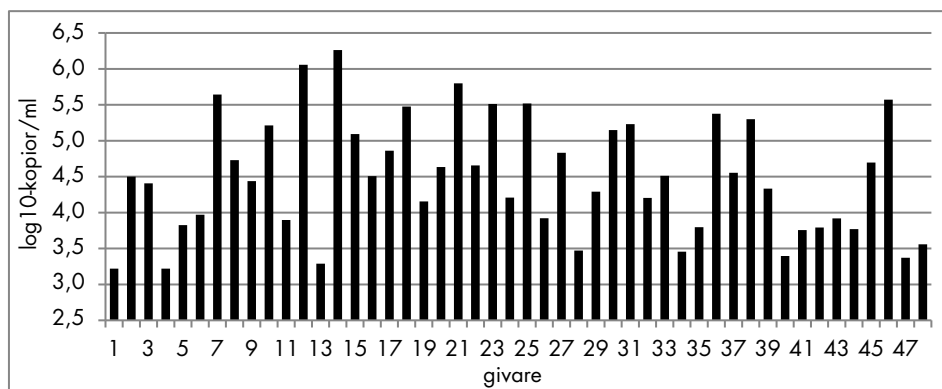


Bild 2. ccfDNA-utbyte av urin från 48 enskilda givare. Urin som samlats in från 48 enskilda givare stabiliserades med Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck). ccfDNA extraherades från 4 ml urin med QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. ccfDNA-utbytet kvantifierades med en intern real-time PCR-analys för kodningssekvensen 18S. Resultaten beräknades som mälkopior per milliliter urinmatning.

Körningsprecision

Variationskoefficienter (CV) fastställdes för extrahering av human ccfDNA från EDTA-plasma. För precisionsanalys kvantifierades ccfDNA med en intern real-time PCR-analys för kodningssekvensen ribosomal 18S. Sammanlagt 10 QIASymphony-körningar utfördes, var och en i 4 batchar (8 replikat per batch). Precisionsdata visas i tabell 1.

Tabell 1. Analys av precisionsestimater

Precision	CV (%)
Inom batch	11,67
Repeterbarhet	13,14
Mellanliggande precision	13,14
Total precision	14,12

Ekvivalent prestanda hos 2 ml- och 4 ml-protokoll

Ekvivalent prestanda hos protokoll för 2 ml och 4 ml provinmatning utvärderades för QIASymphony DSP Circulating DNA Kit med endogent ccfDNA so extraherats från en human EDTA-plasmapool. Sammanlagt 8 oberoende QIASymphony-körningar utfördes, var och en i 4 batchar med 8 replikat per batch. Det linjära området för QIASymphony DSP Circulating DNA Kit-proceduren har fastställts för kodningssekvensen 18S med en intern real-time PCR-analys (bild 3). Skillnaden mellan 2 ml- och 4 ml-protokollen visas i tabell 2 (referensprotokollet har en provinmatning på 4 ml).

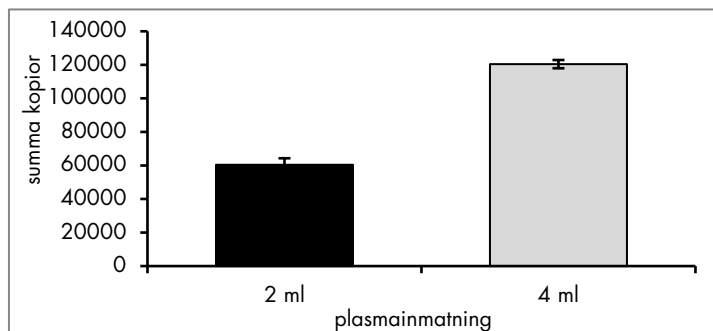


Bild 3. Ekvivalent prestanda med 2 ml- och 4 ml- provinmatningsprotokoll. Det linjära området för ccfDNA-protokollet fastställdes med 2 ml- och 4 ml-protokollen. ccfDNA-utbytet kvantifierades med en intern real-time PCR-analys för kodningssekvensen 18S. Resultaten beräknades som totalt antal kopior per protokoll.

Tabell 2. Skillnad mellan 2 ml- och 4 ml-protokoll (N = 256)

Parameter	Värde
Estimerad andel kopior/ml beräknade med geometriskt medelvärde	1,01
Lägre 95 % konfidensgräns	0,92
Högre 95 % konfidensgräns	1,11
Total precision	14,12

Prestandan hos protokollen för 2 ml och 4 ml provinmatning är ekvivalent, uppmätt i beräknade kopior per milliliter.

Storleksfördelning

För att utvärdera storleksfördelningen på provinmatningen extraherades ccfDNA från en provinmatning på 4 ml med QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, eluerades i 75 µl och därefter utsattes 1 µl eluat för storleksanalys med Agilent® 2100 Bioanalyzer med ett Agilent High Sensitivity DNA Chip. Sammanlagt 5 separata replikat utfördes. En representativ DNA-profil visas för plasma på bild 4 och för urin på bild 5.

Elektroferogrammet för plasma på bild 4 visar den ofta observerade toppen vid cirka 165 bp, med ett intervall från 145 till 196 bp, vilket är längdintervallet för histonbundet DNA i nukleosomen. Elektroferogrammet för urin på bild 5 visar att den dominerande toppen vid cirka 160 bp är bredare, med ett intervall från cirka 145 till 250 bp. Dessutom förekommer en andra topp för urin vid 20–100 bp (vid nivån för den lägre markörtoppen), vilket indikerar en ccfDNA-fraktion med en högre grad av fragmentering. Dessutom visar bild 5 ett högt antal långa DNA-fragment från cirka 2 kb. Hög förekomst av sådana genomiska DNA-fragment hittas ofta i urinprover, sannolika på grund av frisättning av genomiskt DNA från celler som förekommer i urinen.

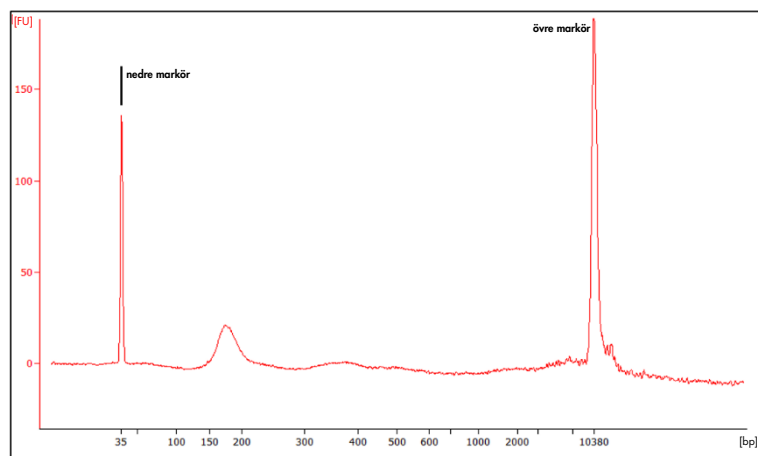


Bild 4. Storleksfördelning av ccfDNA från plasma (Bioanalyzer-profil). ccfDNA extraherades från 4 ml EDTA-plasma med QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. 1 µl eluat utsattes för Agilent High Sensitivity DNA Chip-analys. x-axel: basparsstorlek (bp); y-axel: fluorescensenheter (FU).

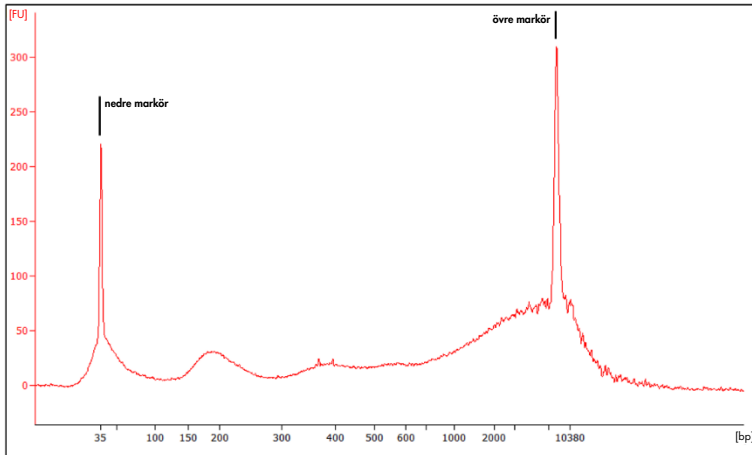


Bild 5. Storleksfördelning av ccfDNA från urin (Bioanalyser-profil). ccfDNA extraherades från 4 ml urin med QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. 1 µl eluat utsattes för Agilent High Sensitivity DNA Chip-analys. x-axel: basparsstorlek (bp); y-axel: fluorescensenheter (FU).

Eluatstabilitet

Eluatstabilitet för QIASymphony DSP Circulating DNA Kit utvärderades med extraherat ccfDNA från en human EDTA-plasmapool. Eluaten förvarades i 2 olika elueringsställsformat: QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; kat.nr 19588) och 1,5 ml Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock-rör. Eluat analyserades i replikat om 8. Stabilitet för DNA i eluat fastställdes med en intern real-time PCR-analys för kodningssekvensen 18S ribosomal RNA.

Eluatstabilitet i 2–8 °C påverkades inte av längden på förvaringsperioden i upp till en månad eller av förvaringsformatet (bild 6). Stabiliteten hos DNA i LoBind-rör påverkades inte av förvaring i –15 °C till –30 °C som omfattade 3 cykler med frysing-upptining efter 7 dagar, en månad och två månader (bild 7).

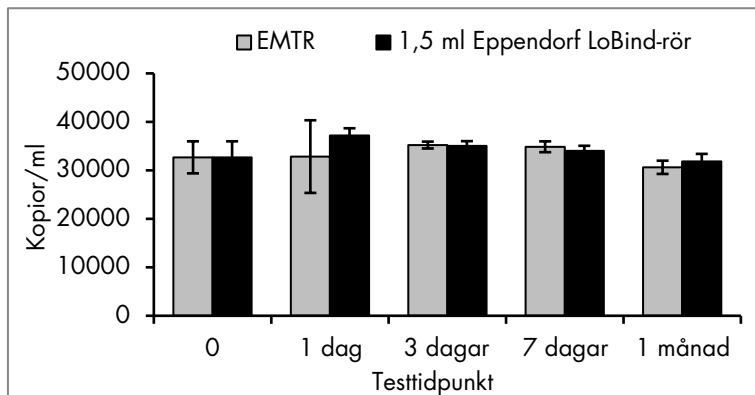


Bild 6. Stabilitet hos ccfDNA i eluat som förvaras i 2–8 °C i 2 rörformat. ccfDNA extraherades från EDTA-plasma med QIASymphony DSP Circulating DNA Kit och förvarades i 2–8 °C under olika testtidpunkter. ccfDNA-utbytet kvantifierades med en intern real-time PCR-analys för kodningssekvensen 18S. Resultaten beräknades som mälkopior per milliliter plasmainmatning.

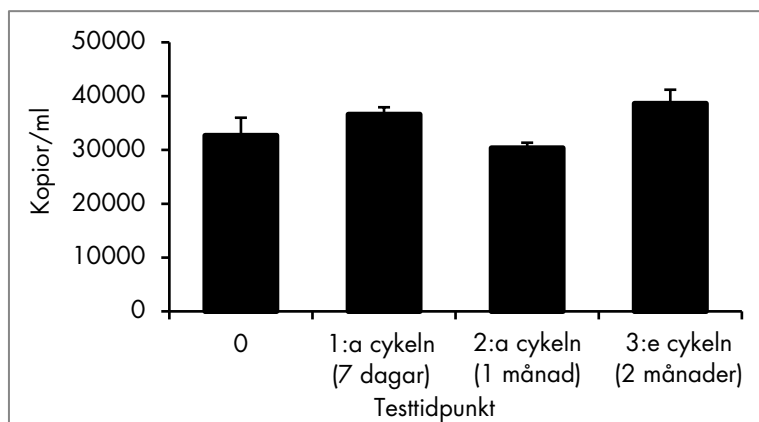


Bild 7. Stabilitet hos ccfDNA i eluat som förvaras i -15 °C till -30 °C inklusive 3 cykler med frysning-upptining. ccfDNA extraherades från EDTA-plasma med QIASymphony DSP Circulating DNA Kit och förvarades i -15 °C till -30 °C i 1,5 ml Eppendorf LoBind-rör. ccfDNA-utbytet fastställdes vid 3 testtidpunkter genom att använda samma eluat vid 3 cykler med frysning-upptining. ccfDNA-utbytet kvantifierades med en intern real-time PCR-analys för kodningssekvensen 18S. Resultaten beräknades som målkopior per milliliter plasmainmatning.

Interfererande ämnen

Human plasma och urin spetsades med olika potentiella interfererande ämnen (se tabell 3) för att testa deras effekt på ccfDNA-extraheringsprestandan hos QS DSP Circulating DNA Kit och efterföljande kompatibilitet för nedströms analys. Eluaten analyserades med en intern real-time PCR-analys för kodningssekvensen 18S och med Qubit® Fluorometer med en High Sensitivity dsDNA-analys.

Tabell 3. Testkoncentrationer för potentiellt interfererande ämnen

Interfererande ämnen	Plasma	Urin
Bilirubin	200 mg/liter*	200 mg/liter*
Hemoglobin	2 g/liter ¹	-
BSA och gammaglobin	Upp till 120 g/liter*	1 g/liter [†]
Triglycerider	5 g/liter*	-
Glukos	10 g/liter*	10 g/liter*
Blod	-	1 % [†]
pH	-	pH 4 och pH 9 [†]

* CLSI EP7-A2 Vol. 25 nr 27

[†] FDA Draft Guidance (11.05.2011)

Inga av de ämnen som anges i tabell 3 är interfererande, förutom att plasmaprover med höga koncentrationer av gammaglobulin (>30 g/liter) kan leda till minskad insamling av cirkulerande cellfritt DNA.

OBS! Testningen utfördes med olika nedströmstillämpningar för en bedömning av kvaliteten hos de extraherade nukleinsyror. Olika nedströmstillämpningar kan dock ha olika krav vad gäller renhet (t.ex. frånvaro av potentiellt interfererande ämnen), så identifieringen och testningen av relevanta ämnen måste också fastställas som en del av utvecklingen av nedströmstillämpningen för de arbetsflöden som inbegriper QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

Korskontaminering

Risken för korskontaminering för QIASymphony DSP Circulating DNA-systemet analyserades genom att utföra tre 96-provskörningar på QIASymphony SP-instrumentet med alternerande positiva och negativa prover. Kvinnlig plasma (negativt prov) och kvinnlig plasma spetsad med klippt manligt gDNA i en koncentration på $1,0E+05$ kopior av SRY1-genen per milliliter plasma (positivt prov) testades som provmaterial för ett modellsystem. Provbereidningen utfördes med det 4 ml-protokoll som omfattar två separata provöverföringar på 2 ml volym vardera. En potentiell kontamination av de negativa kvinnliga plasmaproverna under extraheringskörningarna utvärderades under en efterföljande analys av eluaten med en real-time PCR-analys av den Y-kromosomspecifika genen SRY1.

Ingen korskontaminering detekterades för överföring från prov till prov, batch till batch eller körning till körning.

Kompatibilitet för olika nedströmstillämpningar

Olika nedströmstillämpningar används under utvecklingen av QIASymphony DSP Circulating DNA Kit för att påvisa att de isolerade nukleinsyrorerna är kompatibla med flera olika tekniker för nedströmstillämpningar, inklusive Real Time-PCR (se bild 1, bild 2, bild 3, bild 6 och bild 7), Qubit Fluorometer (proteinanalys och högkänslig dsDNA-analys), Library (se bild 8) och Next Generation Sequencing (NGS).

Elektroferogrammet på bild 8 visar ett exempel på en lyckad adapterligering och efterföljande amplifiering av ccfDNA. Bredvid den framträdande toppen vid 300 bp för nukleosomalt ccfDNA (cirka 165 plus cirka 70 bp för varje adapter) syns även den di-nukleosomala toppen vid cirka 470 bp.

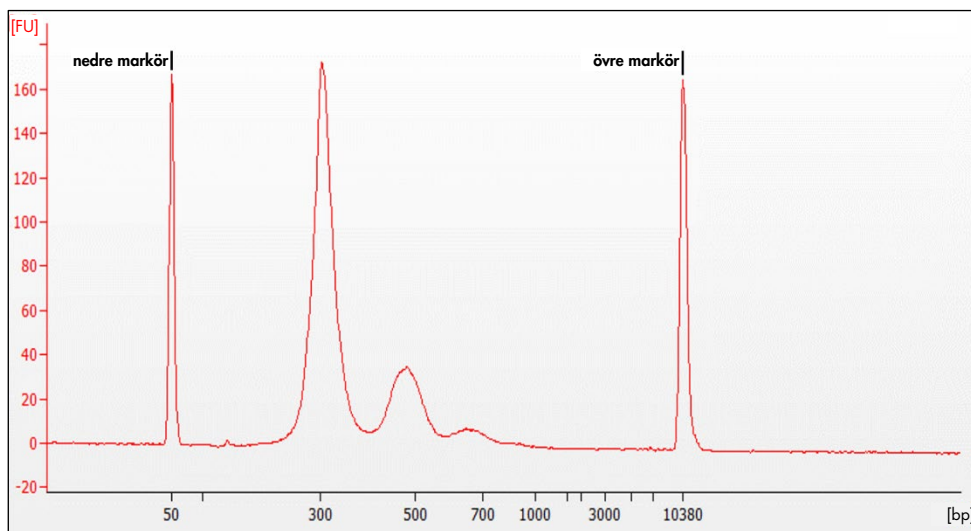













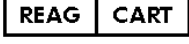


Bild 8. DNA-bibliotek för ccfDNA (enskild givare) extraherat med QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. ccfDNA extraherades från Streck-plasma med 4 ml-protokollet och därefter överfördes 35 μ l eluat till NEBNext[®] Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs). Efter amplifiering och AMPure XP-rening analyserades 1 μ l eluat med Agilent 7500 DNA Kit.

Symboler

Nedanstående symboler finns i användningsinstruktionerna eller på förpackningar och etiketter:

Symbol	Symbolförklaring
	Innehåller reagens som räcker till <N> reaktioner
	Utgångsdatum
	Den här produkten uppfyller kraven i Europeisk Regel 2017/746 för in vitro-diagnostiska medicintekniska enheter.
	In vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer (dvs. komponentetikett)
	Komponenter
	Innehåller
	Antal
	GSI-artikelnnummer
Rn	R betyder revidering av bruksanvisningen och n är revisionsnumret
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare
	Läs bruksanvisningen
	Varning/försiktighet
	Proteinas K
	Brunnsnummer (dvs. reagenskassetbrunn)
	Reagenskasset
	Natriumazid

Symbol

Symbolförklaring

EtOH

Etanol

UDI

Unik enhetsidentifierare

Revisionshistorik

Revision	Beskrivning
R1, juni 2022	<p>Version 2, revision 1</p> <ul style="list-style-type: none">• Uppdatering till version 2 för överensstämmelse med IVDR• Avsnitten om interfererande ämnen, korskontaminering och kompatibilitet för nedströmstillämpningar lades till

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive handbok eller användarmanual för QIAGEN-satsen. Handböcker och bruksanvisningar till QIAGEN-kit finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN teknisk service eller din lokala återförsäljare.

Varumärken: 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 dess dotterbolag). Registrerade namn, varumärken med mera som används i detta dokument ska inte anses som oskyddade enligt lag, även om de inte uttryckligen anges som skyddade.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, med ensamrätt.

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

