

Gebruiksaanwijzing (prestatiekenmerken) QIAsymphony[®] DSP DNA Kit

Versie 2



Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Voor gebruik met de QIAsymphony DSP DNA Mini Kit en QIAsymphony DSP DNA Midi Kit



937236, 937255



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

De QIASymphony DSP DNA Kits zijn uitsluitend bedoeld voor gebruik in combinatie met de QIASymphony SP.

QIASymphony DSP DNA Mini Kits bevatten reagentia voor geautomatiseerde zuivering van totaal-DNA uit humaan volbloed, Buffy Coat, weefsel en in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) weefselmonsters en van viraal DNA uit humaan volbloed. De QIASymphony DSP DNA Midi Kits bevatten reagentia voor geautomatiseerde zuivering van totaal-DNA uit humaan volbloed en Buffy Coat. De prestatiekenmerken zijn echter niet voor elk bloedverzamelbuisje of weefseltype vastgesteld en ze moeten door de gebruiker worden gevalideerd.

Magnetische-deeltjestechologie maakt het mogelijk om nucleïnezuren van hoge kwaliteit, die vrij zijn van eiwitten, nucleasen en andere verontreinigingen te zuiveren. De gezuiverde nucleïnezuren kunnen direct worden gebruikt in vervolgtoeepassingen, zoals amplificatiereacties (PCR). De QIASymphony SP voert alle stappen van de zuiveringsprocedure uit. In een run kunnen maximaal 96 monsters, in partijen van maximaal 24, worden verwerkt.

Hieronder worden geselecteerde prestatiegegevens voor de verschillende toepassingen getoond.

Prestatiekenmerken

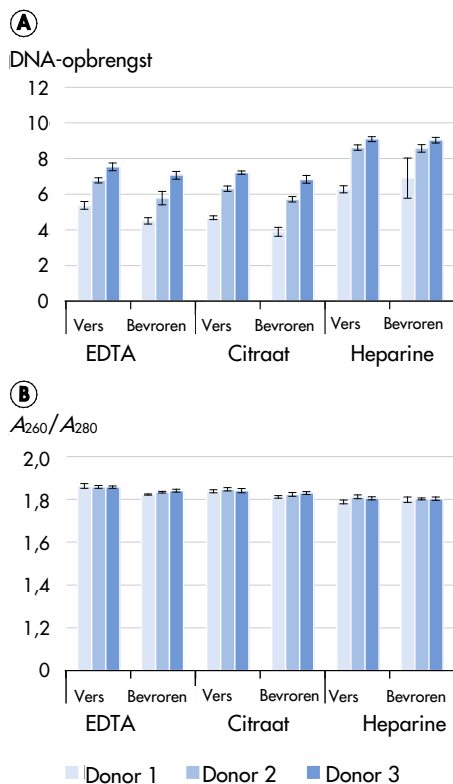
Opmerking: de prestatiekenmerken zijn sterk afhankelijk van verschillende factoren, en houden verband met de specifieke latere toepassing. Deze stabiliteit is voor de QIASymphony DSP DNA Mini en Midi Kits vastgesteld in combinatie met typische latere toepassingen. Methoden voor het isoleren van nucleïnezuuren uit biologische specimens worden gebruikt als een front-end voor meerdere latere toepassingen. Prestatieparameters zoals kruisbesmetting of runprecisie moeten bepaald worden voor dergelijke workflows als onderdeel van de ontwikkeling van latere toepassingen. Daarom is het de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de gehele workflow te valideren om de juiste prestatieparameters vast te stellen.

Basiswerking en compatibiliteit met verschillende latere toepassingen

DNA-bloed en Buffy Coat

DNA-opbrengst

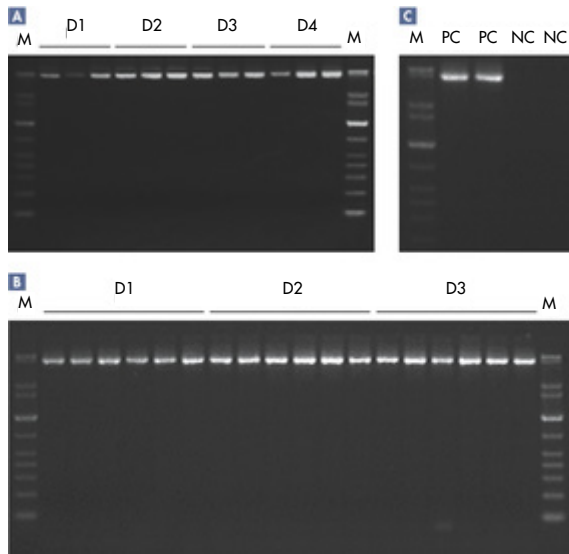
De basiswerking van de QIASymphony DSP DNA Mini Kit werd geëvalueerd met behulp van verschillende verzamelbuisjes en antistollingsmiddelen en vers en bevroren humaan volbloed. Bij 3 gezonde donoren is volbloed afgenomen (gehalte witte bloedcellen [WBC]: 4,0 tot 11,0 x 10⁶ cellen/ml) in 3 verschillende soorten busjes: EDTA, 10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); citraat, 2,7 ml Sarstedt® S-Monovette® 9NC Tube 13 x 75 mm (citraat); heparine, 7,5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (lithium-heparine). Bloed werd vers (bewaard bij 2-8 °C) of bevroren (bewaard bij -20 °C) gebruikt. Genomisch DNA werd gezuiverd uit monsters van 200 µl, met 4 replica's per donor en type busje, met behulp van de QIASymphony DSP DNA Mini Kit en het Blood 200 DSP-protocol met een elutievolume van 200 µl. De DNA-opbrengst en -zuiverheid werd bepaald aan de hand van spectroscopische analyse (afbeelding 1).



Afbeelding 1. De DNA-opbrengst en zuiverheid bij gebruik van verschillende monsterverzamelbuisjes en antistollingsmiddelen met vers en bevroren humaan volbloed. A DNA-opbrengst; balken geven de absolute DNA-opbrengst met standaardafwijking weer. **B** DNA-zuiverheid; balken geven de DNA-zuiverheid met standaardafwijking weer.

DNA-integriteit

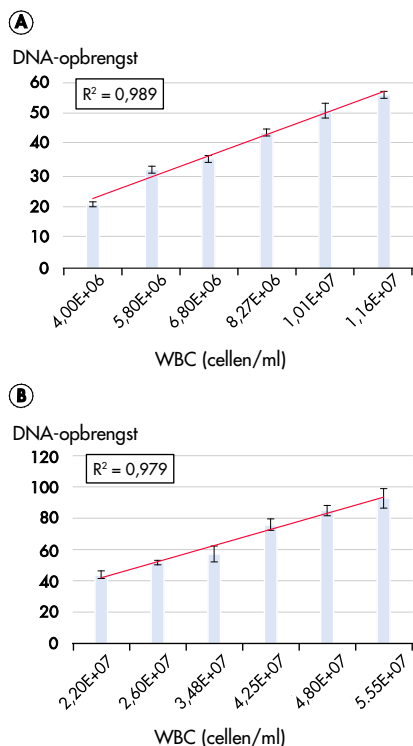
PCR-producten met een groot bereik (5 kb) werden geamplificeerd met behulp van een LongRange PCR-assay (afbeelding 2).



Afbeelding 2. DNA-integriteit getest door PCR met een groot bereik. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** Volbloed werd afgenomen bij 4 gezonde donoren (D) in BD K2E-buisjes. Genomisch DNA voor PCR met een groot bereik werd driemaal gezuiverd uit aliquots van 200 µl met behulp van de QIASymphony DSP DNA Mini Kit en het Blood 200 DSP-protocol met een elutievolume van 200 µl. D1, donor 1; D2, donor 2; D3, donor 3; en D4, donor 4. **B** Volbloed werd afgenomen bij 3 gezonde donoren in BD K2E-buisjes en de Buffy Coat werd bereid. Genomisch DNA werd gezuiverd uit aliquots van 200 µl in 6 replica's met behulp van de QIASymphony DSP DNA Mini Kit en het Buffy Coat 200 DSP-protocol met een elutievolume van 200 µl. D1, donor 1; D2, donor 2; en D3, donor 3. **C** Controles: PC, positieve controle; en NC, negatieve controle.

Correlatie van de DNA-opbrengst afgezet tegen het WBC-gehalte

De prestaties voor de QIASymphony DSP DNA Blood- en Buffy Coat-toepassingen werden geëvalueerd met behulp van bloed- en buffy-coatmonsters met 6 verschillende WBC-gehalten voor ieder monstertype. De WBC-gehalten voor volbloed waren 4×10^6 cellen/ml tot $11,6 \times 10^6$ cellen/ml en de gehalten voor Buffy Coat waren $2,2 \times 10^7$ cellen/ml tot $5,6 \times 10^7$ cellen/ml. DNA-opbrengsten werden bepaald aan de hand van spectroscopische analyse en afgezet tegen het WBC-gehalte (afbeelding 3).



Afbeelding 3. Correlatie van de DNA-opbrengst afgezet tegen het WBC-gehalte. A Genomisch DNA werd gezuiverd uit humaan volbloed van 1 ml in met behulp van de QIASymphony DSP DNA Midi Kit en het Blood 1000 DSP-protocol met een elutievolume van 500 µl. Balken geven de absolute DNA-opbrengst met de standaardafwijking weer. B Genomisch DNA werd gezuiverd uit 400 µl Buffy Coat met behulp van de QIASymphony DSP DNA Midi Kit en het Buffy Coat 400 DSP-protocol met een elutievolume van 400 µl. Balken geven de absolute DNA-opbrengst met de standaardafwijking weer.

Virusbloed

Onderzoeken naar het succespercentage werden uitgevoerd door vooraf gekwantificeerd CMV WHO-standaardmateriaal te verdunnen in CMV-negatief humaan volbloed. Er werd een detectiepercentage van 100% geobserveerd voor monsters met virale belastingen van 90 IE CMV per milliliter (tabel 1).

Tabel 1. Gevoeligheid van de QIASymphony DSP Virus Blood-toepassing

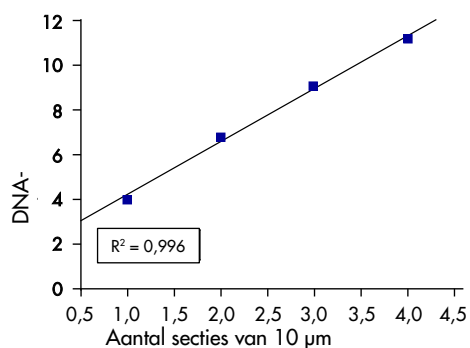
CMV (IE/ml)	Replica's	Hits	Hit (%)
350	18	18	100,00
230	32	32	100,00
115	31	31	100,00
90	32	32	100,00
60	30	24	80,00
30	30	15	50,00
15	30	10	33,33
6	21	5	23,81
2	21	2	9,52
0	15	0	0,00

Humaan volbloed werd afgenomen bij 1 gezonde CMV-negatieve donor in BD K2E-buisjes en verrijkt met CMV WHO-standaardmateriaal bij gebruik van verschillende titers. Viraal DNA werd gezuiverd met behulp van de QIASymphony DSP DNA Mini Kit en het Virus Blood 200 DSP-protocol met een elutievolume van 60 µl. Eluatens werden geanalyseerd met behulp van een CMV real-time PCR-assay.

Weefsel en FFPE-weefsel

DNA-opbrengst

De prestaties van de QIASymphony DSP DNA FFPE-weefseltoepassing zijn geëvalueerd met behulp van 6 replica's van 1-4 FFPE-coupees van 10 µm vers gesneden menselijke milt. DNA-extractie werd uitgevoerd met de QIASymphony DSP DNA Mini Kit in combinatie met het DSP-protocol voor weefsel met lage gehalten. Deparaffinisatie en lyse werden uitgevoerd met de voorbehandelingsmethode met xyleen/ethanol. Het DNA werd geëluëerd in 50 µl elutiebuffer en de DNA-opbrengst werd bepaald aan de hand van spectroscopische analyse (afbeelding 4).



Afbeelding 4. Correlatie van de DNA-opbrengst afgezet tegen het aantal FFPE-weefselcoupees. Zes replica's van 1-4 FFPE-weefselcoupees van 10 µm van een menselijke milt werden gedeparaffiniseerd met behulp van een voorbehandeling met xyleen/ethanol. DNA-extractie werd uitgevoerd op de QIASymphony SP met behulp van de QIASymphony DSP DNA Mini Kit in combinatie met het DSP-protocol voor weefsel met lage gehalten en een elutievolumen van 50 µl.

Analyse van de mutatiestatus van biomarkers door real-time PCR

De analyse van de mutatiestatus van biomarkers werd uitgevoerd met behulp van DNA dat werd geëxtraheerd uit FFPE-secties van een menselijke dikke darm en DNA dat werd geëxtraheerd uit weefselmonsters van een menselijke long.

Voor DNA-extractie uit FFPE-weefselmonsters werden 3 secties van 10 µm uit een menselijke dikke darm gebruikt voor monsterbereiding. DNA-extractie werd uitgevoerd met behulp van voorbehandeling met een Deparaffinization Solution en het DSP-protocol voor weefsel met lage gehalten in combinatie met een elutievolumen van 100 µl. Mutatieanalyse van de KRAS-biomarker werd uitgevoerd met een real-time PCR-assay voor KRAS-detectie, in overeenstemming met de handleiding van de assay. C_T -waarden van de controleassay lagen binnen het gedefinieerde bereik en mutatiedetectieanalyse wees een aminozuursubstitutie uit in codon 12, aangetoond door een ΔC_T -waarde van 4,17, wat onder de gedefinieerde grenswaarde van 8 ligt voor de detectie van een 12SER-mutatie (tabel 2).

Tabel 2. De resultaten van de mutatieanalyse van de KRAS-biomarker in FFPE-weefsel

Monster	Reactie	C _T -waarde doelmateriaal	C _T -waarde interne controle	ΔC _T *
Controle zonder template	Controle	0,00	32,75	-
	12ALA	0,00	32,65	-
	12ASP	0,00	32,69	-
	12ARG	0,00	32,86	-
	12CYS	0,00	32,35	-
	12SER	0,00	32,76	-
	12VAL	0,00	32,41	-
	13ASP	0,00	32,26	-
Standaard	Controle	25,95	32,73	-
	12ALA	26,39	32,29	0,44
	12ASP	26,54	32,15	0,59
	12ARG	26,35	32,14	0,40
	12CYS	26,31	32,47	0,36
	12SER	26,50	32,34	0,55
	12VAL	25,80	31,92	-0,15
	13ASP	27,09	32,54	1,14
FFPE-weefsel (humane dikke darm)	Controle	24,94	31,98	-
	12ALA	n.d.	32,42	-
	12ASP	n.d.	32,73	-
	12ARG	n.d.	33,05	-
	12CYS	n.d.	32,74	-
	12SER	29,11	32,34	4,17
	12VAL	n.d.	32,81	-
	13ASP	n.d.	33,20	-

* $\Delta C_T = M C_T - C C_T$, waarbij M voor mutatie en C en voor controle staat; n.d., niet gedetecteerd.

Voor DNA-extractie uit bevroren weefselmonsters werd 25 mg humaan longweefsel gebruikt voor monsterbereiding met het DSP-protocol voor weefsel met hoge gehalten en een elutievolume van 200 µl. De mutatieanalyse van de EGFR-biomarker is uitgevoerd met behulp van een real-time PCR-assay voor EGFR. Analyse van de controle en mutatiedetectie is uitgevoerd zoals beschreven in de handleiding van de assay. De resultaten toonden een deletie aan binnen het EGFR-gen, zoals aangetoond door een ΔC_T-waarde van 2,47. Dit ligt onder de gedefinieerde grenswaarde van 12 voor de detectie van een mutatie (tabel 3).

Tabel 3. De resultaten van de mutatieanalyse van de EGFR-biomarker in bevroren weefsel

Monster	Reactie	C _T -waarde doelmateriaal	C _T -waarde interne controle	ΔC _T *
Controle zonder template	Controle	0,00	31,71	-
	T790M	0,00	32,36	-
	Deleties	0,00	31,75	-
	L858R	0,00	32,05	-
	L861Q	0,00	31,77	-
	G719X	0,00	31,68	-
	S768I	0,00	32,25	-
	Ins	0,00	31,84	-
	Standaard	Controle	28,78	31,05
T790M		30,08	31,13	1,30
Deleties		28,23	31,19	-0,55
L858R		27,58	30,83	-1,20
L861Q		27,80	30,86	-0,98
G719X		27,80	30,90	-0,98
S768I		29,28	31,41	0,50
Ins		28,00	31,64	-0,78
Weefsel (humane long)		Controle	25,76	31,23
	T790M	n.d.	31,99	-
	Deleties	28,23	30,99	2,47
	L858R	n.d.	31,33	-
	L861Q	n.d.	31,98	-
	G719X	n.d.	32,06	-
	S768I	n.d.	31,88	-
	Ins	n.d.	31,62	-

* $\Delta C_T = M C_T - C C_T$, waarbij M voor mutatie en C en voor controle staat; n.d., niet gedetecteerd.

Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid

DNA-bloed

DNA-extractie werd uitgevoerd met het Blood 200 DSP-protocol met een elutievolume van 200 µl. De herhaalbaarheid werd geëvalueerd door één gebruiker 3 onafhankelijke runs (elk 96 monsters) uit te laten voeren op 3 verschillende dagen. Elke run bestond uit 4 batches van 24 monsters (tabel 4 en tabel 5).

De reproduceerbaarheid werd geëvalueerd door 3 onafhankelijke runs (elk 96 monsters) uit te laten voeren op 3 verschillende dagen door 3 verschillende gebruikers op verschillende QIASymphony SP-instrumenten. Elke run bestond uit 4 batches van 24 monsters (tabel 6 en tabel 7).

Tabel 4. Resultaten van de herhaalbaarheidsevaluatie

Run	Partij	n	Gemiddelde DNA-opbrengst (µg)	SD	CV
1	1	24	5,32	0,22	4,22
	2	24	4,90	0,22	4,54
	3	24	4,95	0,21	4,26
	4	24	5,05	0,18	3,60
2	1	24	5,17	0,30	5,84
	2	24	4,90	0,15	3,14
	3	24	4,82	0,20	4,13
	4	24	4,87	0,17	3,52
3	1	24	5,11	0,17	3,33
	2	24	4,84	0,24	4,91
	3	24	4,87	0,16	3,38
	4	24	4,78	0,16	3,38
Totaal	-	288	4,96	-	-

n, aantal replica's; SD, standaardafwijking; CV, variatiecoëfficiënt.

Tabel 5. Nauwkeurigheidsgegevens voor herhaalbaarheidsevaluatie

	SD	CV
Tussen partijen binnen dezelfde run	0,25	4,95
Totale herhalingsnauwkeurigheid	0,26	5,18

SD, standaardafwijking; CV, variatiecoëfficiënt.

Tabel 6. Resultaten van de reproduceerbaarheidsevaluatie

Run	Partij	n	Gemiddelde DNA-opbrengst (µg)	SD	CV
1	1	24	5,32	0,22	4,22
	2	24	4,90	0,22	4,54
	3	24	4,95	0,21	4,26
	4	24	5,05	0,18	3,60
2	1	24	5,73	0,22	3,81
	2	24	5,56	0,26	4,63
	3	24	5,40	0,20	3,63
	4	24	5,46	0,21	3,89
3	1	24	5,73	0,26	4,62
	2	24	5,54	0,24	4,40
	3	24	5,41	0,18	3,34
	4	24	5,49	0,17	3,16
Totaal	-	288	5,38	-	-

n, aantal replica's; SD, standaardafwijking; CV, variatiecoëfficiënt.

Tabel 7. Nauwkeurigheidsgegevens voor de reproduceerbaarheidsevaluatie

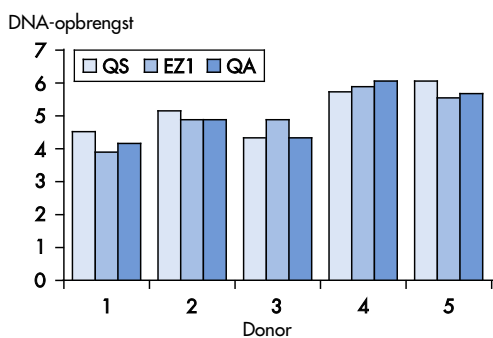
	SD	CV
Tussen partijen binnen dezelfde run	0,25	4,73
Totale herhalingsnauwkeurigheid	0,38	7,03

SD, standaardafwijking; CV, variatiecoëfficiënt.

Relatieve prestaties

DNA-bloed

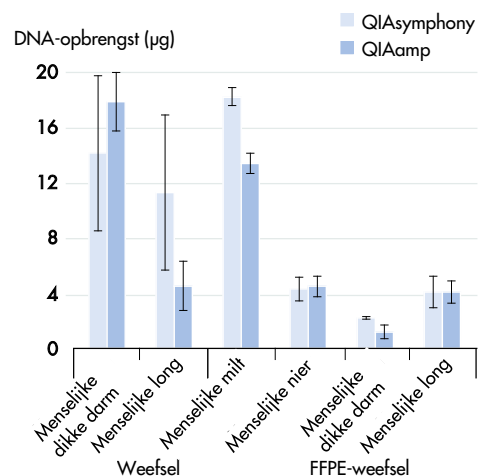
De prestaties van het QIASymphony DSP DNA-bloedsysteem werden vergeleken met het EZ1[®] DSP DNA-bloedsysteem en de handmatige bereidingsprocedure van de QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit. DNA werd uit verschillende bloedmonsters gezuiverd en geanalyseerd op DNA-opbrengst (afbeelding 5).



Afbeelding 5. Vergelijking van DNA-opbrengsten van verschillende zuiveringssystemen voor DNA uit bloed. Volbloed werd afgenomen bij 5 gezonde donoren in BD K2E-buisjes. Voor alle methoden werden monsterinvoervolumes van 200 µl en elutievolume van 200 µl gebruikt. QS, QIASymphony DSP DNA Mini Kit en het Blood 200 DSP-protocol; EZ1, EZ1 Advanced XL met de EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA, QIAamp DNA Blood Mini Kit. De balken geven de absolute DNA-opbrengst voor ieder monster weer.

Weefsel en FFPE-weefsel

De prestaties van de QIASymphony DSP DNA Mini Kit werden vergeleken met de prestatie van de handmatige QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit en de QIAamp DSP DNA Mini Kit met gebruik van FFPE-weefsel en respectievelijk vers en bevroren weefsels als monstermateriaal. De handmatige en geautomatiseerde monsterbereiding en de kwantificering van de DNA-opbrengsten werden tegelijkertijd uitgevoerd. De DNA-opbrengsten na extractie uit verse/bevroren FFPE-weefselmonsters bij gebruik van de QIASymphony DSP DNA Mini Kit, QIAamp DSP DNA Mini Kit (weefsel) en de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE-weefsel) worden weergegeven in afbeelding 6.



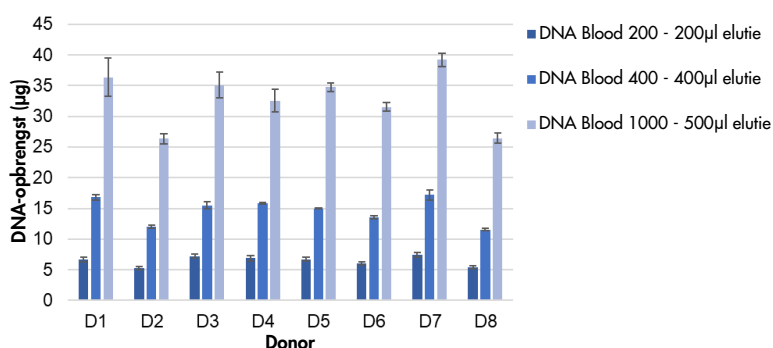
Afbeelding 6. DNA-extractie uit weefsel- en FFPE-weefselmonsters. Verse/bevroren weefselmonsters uit de menselijke long en dikke darm werden in stukken van 6 x 25 mg gesneden. Drie stukken van elk weefseltype werden gebruikt voor monsterbereiding met de QIASymphony SP in combinatie met het DSP-protocol voor weefsel met hoge gehalten. DNA-extractie voor de overige monsters werd uitgevoerd met de QIAamp DSP DNA Mini Kit. Het DNA werd geëluëerd in 200 µl en de DNA-opbrengst werd bepaald aan de hand van spectroscopische analyse. Voor DNA-extractie uit FFPE-weefsel werden 12 replica's met 3 FFPE-weefselcoupes van 10 µm uit verschillende humane organen voorbereid. Zes monsters werden gebruikt voor monsterbereiding met de QIASymphony SP in combinatie met de voorbehandeling met een Deparaffinization Solution en het DSP-protocol voor weefsel met lage gehalten. DNA-extractie voor de overige monsters werd uitgevoerd met de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Het DNA werd geëluëerd in 50 µl en de DNA-opbrengst werd bepaald aan de hand van spectroscopische analyse. Balken geven de absolute DNA-opbrengst met de standaardafwijking weer.

Bereik monsterinvoer/eluaatuitvoer

DNA-bloed

Verscheidene monsterinvoer- en eluaatuitvoerbereiken voor de DNA-bloedtoepassing werden vergeleken met behulp van monsters van bloeddonoren met een bereik van het WBC-gehalte tussen $5,0$ en $8,0 \times 10^6$ cellen/ml.

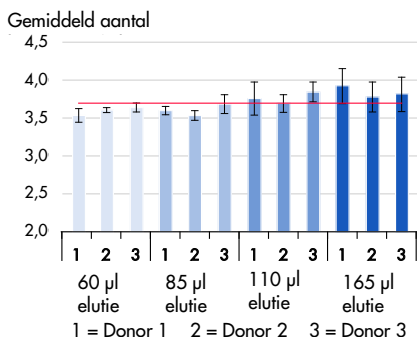
Volbloed werd afgenomen bij 8 gezonde donoren in BD K2E-buisjes. DNA werd gezuiverd uit 6 replica's, waarvoor bij elk de QIASymphony DSP DNA Mini/Midi Kit en het DNA Blood 200 DSP-protocol met een elutievolumen van $200 \mu\text{l}$ werd gebruikt, het DNA Blood 400 DSP-protocol met een elutievolumen van $400 \mu\text{l}$ en het DNA Blood 1000 DSP-protocol met een elutievolumen van $500 \mu\text{l}$ (afbeelding 7).



Afbeelding 7. Vergelijking van verschillende monsterinvoeren en elutievolumes van zuiveringssystemen voor bloed-DNA. Volbloed werd afgenomen bij 8 gezonde donoren in BD K2E-buisjes. DNA-extractie werd uitgevoerd met het DNA Blood 200-protocol met een elutievolumen van $200 \mu\text{l}$, het DNA Blood 400-protocol met een elutievolumen van $400 \mu\text{l}$ en het DNA Blood 1000-protocol met een elutievolumen van $500 \mu\text{l}$. De DNA-opbrengst werd bepaald aan de hand van spectroscopische analyse. De balken geven de absolute DNA-opbrengst (gemiddelde waarde met standaardafwijking) voor elke donor aan.

Virusbloed

Volbloed werd afgenomen bij 3 gezonde donoren, met een bereik van het WBC-gehalte tussen $4,0$ en $11,0 \times 10^6$ cellen/ml, in BD K2E-buisjes en verrijkt met CMV-standaardmateriaal (titer $3,7 \log$ kopieën/ml). Viraal DNA werd gezuiverd uit 7 replica's. Voor elke replica werd de QIASymphony DSP DNA Mini Kit en het Virus Blood 200 DSP-protocol gebruikt met 4 verschillende elutievolumes (afbeelding 8).



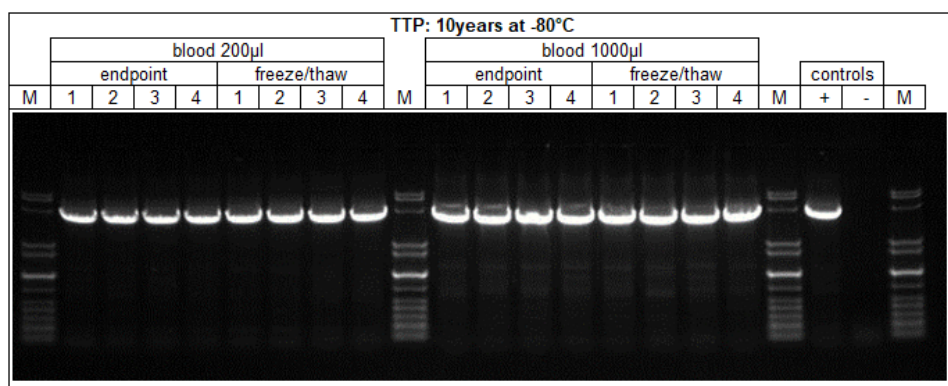
Afbeelding 8. Vergelijking van virale DNA-kwantificering voor verschillende elutievolumes. Eluaten van ieder donormonster en elutievolumen ($60 \mu\text{l}$, $85 \mu\text{l}$, $110 \mu\text{l}$ en $165 \mu\text{l}$) werden geanalyseerd met een CMV real-time PCR-assay. De rode lijn geeft de doeltiter weer en balken tonen het gemiddelde aantal logkopieën per milliliter met de standaardafwijking.

Stabiliteit van het eluaat

Opmerking: de stabiliteit van eluaat is sterk afhankelijk van verschillende factoren, en houdt verband met de specifieke latere toepassing. Deze stabiliteit is voor de QIASymphony DSP Mini en Midi Kit vastgesteld in combinatie met typische latere toepassingen. Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de gebruiksaanwijzing voor de specifieke latere toepassing die in het laboratorium wordt gebruikt te raadplegen en/of de gehele workflow te valideren om de juiste opslagomstandigheden te bepalen.

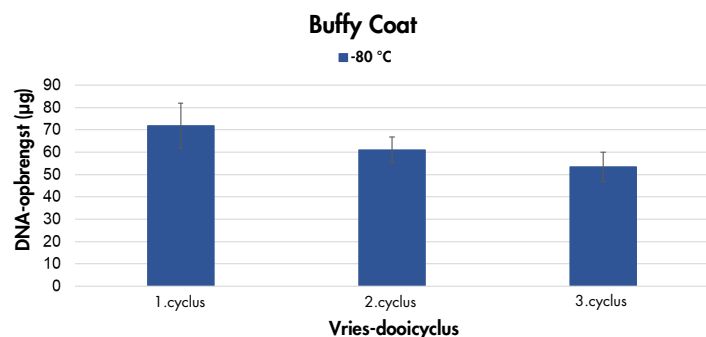
DNA-bloed en Buffy Coat

De stabiliteit van het eluaat voor de DNA-bloedtoepassing is getest met behulp van eluaten van QS-runs die zijn uitgevoerd met het DNA Blood 200-protocol met een elutievolume van 200 µl en met het DNA Blood 1000-protocol met een elutievolume van 500 µl. Eluaten werden bij kamertemperatuur, 2-8 °C, -20 °C en -80 °C bewaard in Sarstedt Tubes van 2 ml. De DNA-opbrengst en zuiverheid werden bepaald aan de hand van spectroscopische analyse. De DNA-integriteit werd geanalyseerd met behulp van gel-elektroforese en een LongRange PCR-assay (afbeelding 9).



Afbeelding 9. Eluaatstabiliteit voor DNA-bloed. Het DNA werd gezuiverd met behulp van het DNA Blood 200 µl- en 1000 µl-protocol. Eluaten werden bij -80 °C bewaard in Sarstedt Tubes van 2 ml. Er werden vier replica's geanalyseerd. De DNA-integriteit is getest met PCR met een groot bereik. In de afbeeldingen worden de resultaten na opslag gedurende 10 jaar weergegeven. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

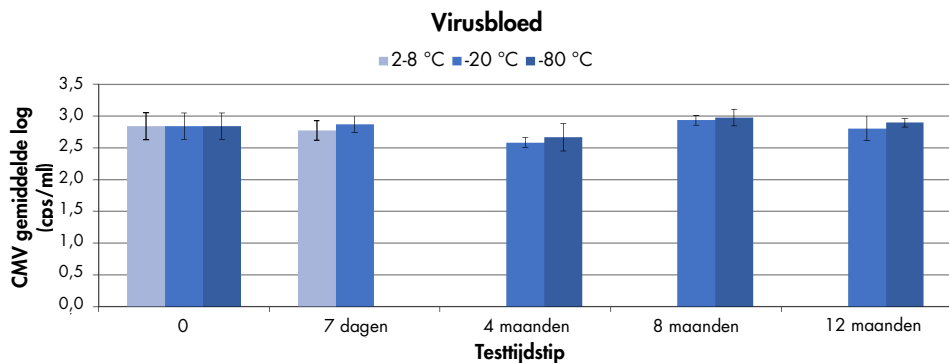
De stabiliteit van het eluaat voor de Buffy Coat-toepassing is getest met behulp van eluaten van QS-runs die zijn uitgevoerd met het BC 400 µl-protocol en een elutievolume van 200 µl. Eluaten werden bij kamertemperatuur, 2-8 °C, -20 °C en -80 °C bewaard in Sarstedt Tubes van 2 ml en Elution Micro-buisjesrekken. Eluaten hebben bovendien vries-dooitests bestaande 3 cycli ondergaan (afbeelding 10). De DNA-opbrengst en -zuiverheid werd bepaald aan de hand van spectroscopische analyse. De DNA-integriteit werd geanalyseerd met behulp van gel-elektroforese en een LongRange PCR-assay (reactie van 50 µl).



Afbeelding 10. Vries-dooicycli van eluaat voor Buffy Coat. Het DNA werd gezuiverd met behulp van het DNA BC 400 µl-protocol. Uit EDTA-bloed werd Buffy Coat gegenereerd. Eluaten zijn bewaard in Sarstedt Tubes van 2 ml. De opbrengst aan DNA werd bepaald op de testtijdstippen met gebruik van hetzelfde eluaat bij 3 vries-dooicycli. De DNA-opbrengst werd bepaald aan de hand van spectroscopische analyse. De balken geven de absolute DNA-opbrengst (gemiddelde waarde met standaardafwijking) aan.

Virusbloed

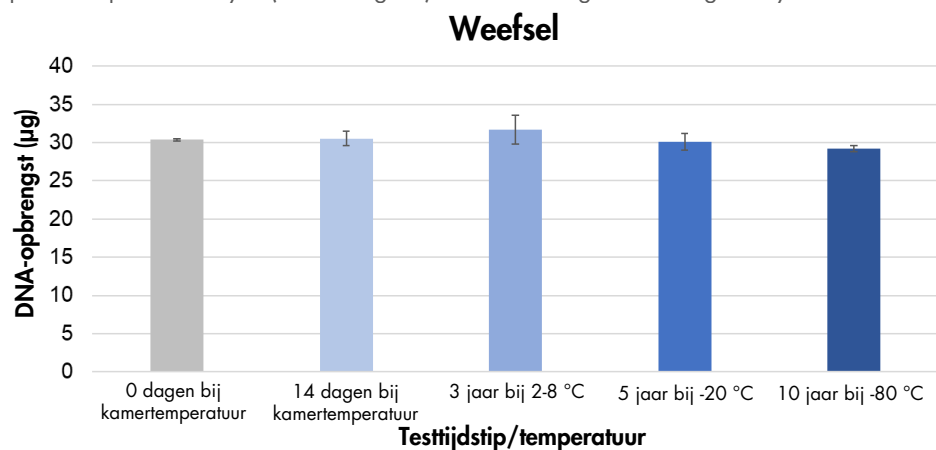
De stabiliteit van het eluaat voor de virusbloedtoepassing is getest met behulp van eluaten van QS-runs die zijn uitgevoerd met het Virus Blood 200-protocol met een elutievolume van 60 µl. Als monstermateriaal werd K₂ EDTA-bloed verrijkt met commerciële CMV-standaard (titer 2,7 log kopieën/ml) gebruikt. Eluaten werden bij 2-8 °C, -20 °C en -80 °C bewaard in Sarstedt Tubes van 2 ml. Eluaten zijn geanalyseerd met een CMV real-time assay (afbeelding 11). Hieronder worden de resultaten van verschillende testtijdstippen weergegeven.



Afbeelding 11. Eluaatstabiliteit voor virusbloedtoepassing. EDTA-bloedmonsters, verrijkt met de commerciële CMV-standaard, zijn gezuiverd met het Virus Blood 200-protocol. Eluaten zijn bij verschillende temperaturen bewaard in Elution Micro-buisjesrekken en Sarstedt Tubes van 2 ml. Per testtijdstip zijn er 4 replica's geanalyseerd. De balken geven de CMV-titer (gemiddelde logwaarde met standaardafwijking) aan.

Weefsel

De stabiliteit van het eluaat voor de weefselttoepassing is getest met behulp van het Tissue HC 200 µl-protocol en een elutievolume van 200 µl. Als monstermateriaal is er verse runderlever gebruikt. Eluaten werden bij kamertemperatuur, 2-8 °C, -20 °C en -80 °C bewaard in Sarstedt Tubes van 2 ml en Elution Micro-buisjesrekken. De DNA-opbrengst en zuiverheid werden bepaald aan de hand van spectroscopische analyse (afbeelding 12). De DNA-integriteit werd geanalyseerd met behulp van gel-elektroforese.

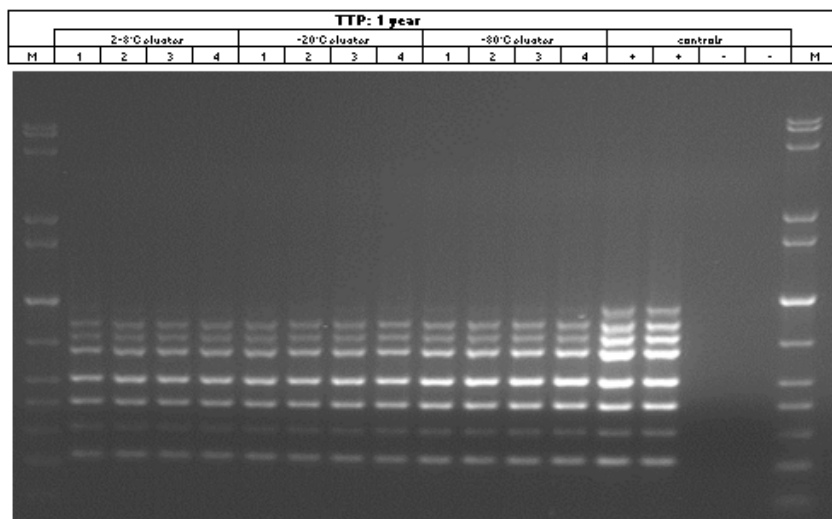


Afbeelding 12. Eluaatstabiliteit voor weefsel. Het DNA werd gezuiverd met behulp van het DNA Tissue HC-protocol met een elutievolume van 200 µl. Als monstermateriaal is er verse runderlever gebruikt. Eluaten zijn bij verschillende temperaturen bewaard in Elution Micro-buisjesrekken en Sarstedt Tubes van 2 ml. Per testtijdstip zijn er 4 replica's geanalyseerd. De DNA-opbrengst werd bepaald aan de hand van spectroscopische analyse. De balken geven de absolute DNA-opbrengst (gemiddelde waarde met standaardafwijking) aan.

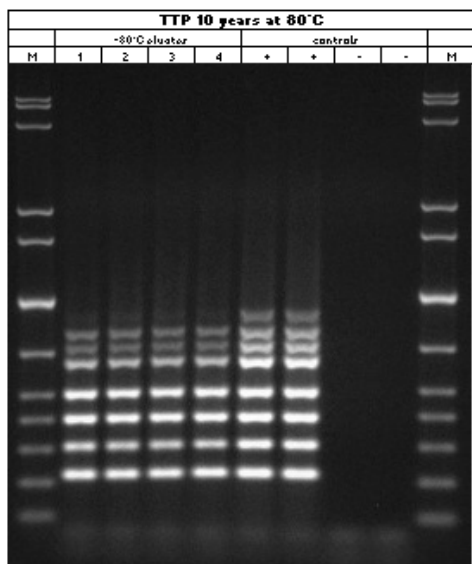
FFPE-weefsel

De stabiliteit van het eluaat voor de FFPE-weefseltoepassing is getest met behulp van het Tissue LC 200 µl-protocol en een elutievolume van 100 µl. Als monstermateriaal werd er commercieel humaan FFPE-weefsel gebruikt. Eluaten werden bij kamertemperatuur, 2-8 °C, -20 °C en -80 °C bewaard in Sarstedt Tubes van 2 ml en Elution Micro-buisjesrekken. Eluaten zijn geanalyseerd met een Inhouse humaan 8-plex PCR-assay (afbeelding 13). Hieronder worden de resultaten van twee testtijdstippen weergegeven.

A:



B:



Afbeelding 13. Eluaatstabiliteit voor FFPE-weefsel. Het DNA werd gezuiverd met behulp van het DNA Tissue LC-protocol. Als monstermateriaal werd er commercieel FFPE-weefsel gebruikt. Eluaten zijn bij verschillende temperaturen bewaard in Elution Micro-buisjesrekken en Sarstedt Tubes van 2 ml. Per testtijdstip zijn er 4 replica's geanalyseerd. Eluaten werden geanalyseerd met een Inhouse humaan 8-plex PCR-assay.

Interfererende stoffen

De invloed van remmende stoffen, die aanwezig kunnen zijn in volbloed, op de prestaties van de DNA-bloedtoepassing, virusbloedtoepassing en weefseltoepassing werd getest door het toevoegen van de volgende stoffen:

Tabel 8. Potentiële interfererende stoffen die voor de verschillende toepassingen zijn getest.

Interfererende stoffen	Concentratie	Bloed	Virusbloed	weefsel
Bilirubine	200 mg/l	√	√	√
Hemoglobine	200 g/l	√	√	
Triglyceriden	30 g/l	√	√	√
Eiwit	120 g/l	√	√	√

Opmerking: '√' geeft aan welke monstermaterialen werden getest op de respectieve potentiële interfererende stof.

Voor hemoglobine (200 g/l) en eiwit (120 g/l) werden de bestaande gehalten in het bloedmonster bepaald en werd aanvullende hemoglobine of eiwit toegevoegd om de aangegeven concentratie van respectievelijk 200 g/l of 120 g/l te bereiken. Voor bilirubine (200 mg/l) en triglyceriden (30 g/l) werd de totale hoeveelheid van elke stof opgeteld bij de monsters om de aangegeven concentraties te bereiken.

Voor weefsel werd de totale hoeveelheid van elke stof rechtstreeks aan de lysaten toegevoegd, waarbij geen analyse van de bilirubine-, triglyceride- of eiwitconcentratie van het gebruikte weefselmonster werd uitgevoerd.

Potentiële interfererende stoffen (zoals geneesmiddelen) en overeenkomende concentratie zijn zeer specifiek voor latere toepassingen en mogelijke eerdere medische behandelingen van een patiënt en moet onderzocht worden tijdens verificatie van dergelijke latere toepassingen met behulp van de QIASymphony DSP DNA Mini en Midi Kits.

Opmerking: de testen werden uitgevoerd met behulp van typische latere toepassingen, waarbij de kwaliteit van de geëxtraheerde nucleïnezuren werd beoordeeld. Verschillende latere toepassingen kunnen echter verschillende eisen met betrekking tot zuiverheid hebben (d.w.z. afwezigheid of concentratie van potentieel interfererende stoffen), zodat het bepalen en testen van relevante stoffen en respectieve concentraties ook plaats moet vinden als onderdeel van de ontwikkeling van latere toepassingen voor elke workflow waarvoor de QIASymphony DSP Mini en Midi Kits gebruikt worden.

Opmerking: onthoud dat er tijdens de ontwikkeling van de QIASymphony DSP DNA Midi Kit geen indicaties zijn geobserveerd dat heparine een negatieve invloed op de werking heeft. In ISO 20186-2:2019(E) staat echter vermeld dat heparine uit bloedverzamelbuisjes invloed kan hebben op de zuiverheid van de geïsoleerde nucleïnezuren en mogelijke carry-over naar eluaten remmingen kan veroorzaken in bepaalde latere toepassingen. Het is daarom de verantwoordelijkheid van de gebruiker om te valideren of heparine een negatieve invloed op zijn/haar workflow heeft.

DNA-bloed en Buffy Coat

Voor de DNA-bloedtoepassingen zijn er test uitgevoerd met behulp van het DSP DNA 1000-protocol, dat het hoogste monsterinvolumedeckt, met elutie volumes van 200 en 500 µl.

Eluaten werden geanalyseerd op DNA-opbrengst en zuiverheid aan de hand van spectroscopische analyse. De PCR-compatibiliteit werd getest met behulp van een real-time PCR en een eindpunt-PCR-assay.

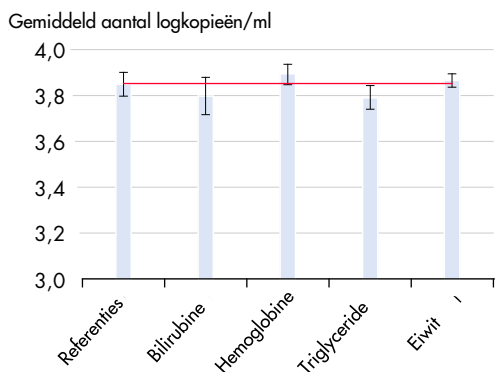
Geen van de in tabel 9 vermelde stoffen zijn interfererend. Bloedmonsters met hoge concentraties triglyceriden (> 30 g/l) kunnen echter tot een verminderde gDNA-opbrengst leiden.

Virusbloed

Voor de virusbloedtoepassing werden tests uitgevoerd met behulp van het DSP Virus Blood 200-protocol met een elutievolume van 60 µl. CMV-negatieve bloedmonsters werden verrijkt met 500 kopieën/ml (lage concentratie) en 1×10^4 kopieën/ml (hoge concentratie, afbeelding 14) van een commerciële CMV-standaard.

Eluaten werden geanalyseerd met behulp van een CMV real-time PCR-assay.

Geen van de in tabel 9 vermelde stoffen zijn interfererend. Bloedmonsters met hoge concentraties triglyceriden (> 30 g/l) kunnen echter tot een verminderde zuivering van viraal DNA leiden.



Afbeelding 14. Test voor remmende stoffen. Volbloed werd afgenomen bij 1 gezonde donor in BD K2E-buisjes en verrijkt met CMV-standaardmateriaal (titer 4,0 logkopieën/ml). Vijf monsters werden getest door het toevoegen van mogelijke remmende stoffen en viraal DNA werd gezuiverd uit 4 replica's van ieder monster met behulp van de QIASymphony DSP DNA Mini Kit en het Virus Blood 200 DSP-protocol met een elutievolume van 165 µl. Eluaten werden geanalyseerd met behulp van een CMV real-time PCR-assay. De rode lijn geeft de bepaalde titer voor referentiemonsters die niet werden verrijkt met remmende stoffen weer en balken tonen het gemiddelde aantal logkopieën per milliliter met de standaardafwijking.

Weefsel

Voor (vers en bevroren) DNA-weefsel werden tests uitgevoerd met behulp van het DSP DNA HC-protocol met een elutievolume van 200 µl.

Eluaten werden geanalyseerd op DNA-opbrengst en zuiverheid aan de hand van spectroscopische analyse. De PCR-compatibiliteit werd getest met behulp van een real-time PCR-assay.

Van geen van de in tabel 9 vermelde stoffen werd vastgesteld dat ze een negatieve invloed hadden op de monsterbereiding.

FFPE-weefsel

Voor FFPE-weefsel werden tests uitgevoerd met behulp van het DSP DNA LC-protocol met een elutievolume van 50 µl.

De stoffen (raadpleeg tabel 9) werden rechtstreeks aan het lysaat toegevoegd.

Tabel 9. Potentiële interfererende stoffen die voor de verschillende toepassingen zijn getest.

Interfererende stoffen	Concentratie in lysaat
Xyleen	Maximaal 11%
Ethanol	Maximaal 11%
Deparaffinization Solution	Maximaal 11%
Paraffine	Coupe van 0,1 μ M

Eluaten werden geanalyseerd op DNA-opbrengst en zuiverheid aan de hand van spectroscopische analyse. De PCR-compatibiliteit werd getest met behulp van een real-time PCR en een Inhouse humaan 8-plex PCR-assay.

Van geen van de in tabel 9 vermelde stoffen werd vastgesteld dat ze een negatieve invloed hadden op de monsterbereiding.

Kruisbesmetting





DNA-bloed

Het risico op kruisbesmetting van de QIASymphony DNA Blood-toepassing werd geanalyseerd door het uitvoeren van vier 96-monsterruns op het QIASymphony SP-instrument met afwisselende dambordpatronen (afwisselend positieve en negatieve monsters), onderbroken door volledig negatieve batches. Mannelijk bloed (met een WBC-gehalte van $\geq 1,0 \times 10^7$ cellen/ml en vrouwelijk bloed met een WBC-gehalte tussen de $4,0 \times 10^6$ en 9×10^6 cellen/ml) werd gebruikt als modelsysteem. De monsterbereiding werd uitgevoerd met het Blood 1000 μ l-protocol, dat het hoogste monstervolume dekt. Mogelijke besmetting van de negatieve vrouwelijke monsters tijdens de extractieruns werd beoordeeld door een navolgende analyse van de eluaten met behulp van een real-time PCR voor het Y-chromosoom.

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

Symbolen

Dit document bevat de volgende symbolen. Raadpleeg de handleiding voor een volledige lijst met symbolen die worden gebruikt in de gebruiksaanwijzing, op de verpakking of op de labels.

Symbool	Symbooldefinitie
	Dit product voldoet aan de vereisten van de Europese regelgeving 2017/746 inzake in-vitrodiagnostische medische hulpmiddelen.
	In-vitrodiagnostisch medisch hulpmiddel
	Catalogusnummer
Rn	'R' staat voor de revisie van de gebruiksaanwijzing; 'n' is het revisienummer
	Fabrikant

Revisiegeschiedenis

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

Zie de handleiding van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. Handleidingen en gebruiksaanwijzingen 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®, QIASymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). Gedeponeerde namen, handelsmerken, etc. die in dit document worden gebruikt, ook al zijn deze niet specifiek als zodanig aangeduid, mogen niet worden beschouwd als niet wettelijk beschermd.

06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

