

Brugsanvisning til QIASymphony[®] DSP Circulating DNA Kit (Ydelseskarakteristika)

Version 2



Til in vitro-diagnostisk brug

Til brug med QIASymphony DSP Circulating DNA Kit



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

R1

Ydelseskarakteristika er tilgængelige i digital form og kan findes på fanen Resource (ressourcer) på siden Product på www.qiagen.com.

Generel introduktion

QIASymphony DSP cirkulerende DNA-system er et brugsklart in vitro-system til kvalitativ oprensning af cirkulerende cellefrit DNA (ccfDNA) fra humant plasma og urin.

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit er kun beregnet til brug sammen med QIASymphony SP-instrumentet.

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit indeholder reagenser til fuldautomatisk og samtidig oprensning af humant ccfDNA fra mange forskellige humane plasm typer (med ccfDNA-profilstabilisatorer, f.eks. Cell-Free DNA BCT® fra Streck® samt uden ccfDNA-profilstabilisatorer, f.eks. EDTA-rør) og human urin (med og uden ccfDNA-profilstabilisatorer). Ydelseskarakteristika for hvert blodprøvetagningsrør er dog ikke blevet fastlagt og skal valideres af brugeren.

Det oprensede ccfDNA er kompatibelt med en lang række efterfølgende anvendelser, såsom PCR-kemi, fluorescensbaserede kvantificeringsanalyser eller NGS.

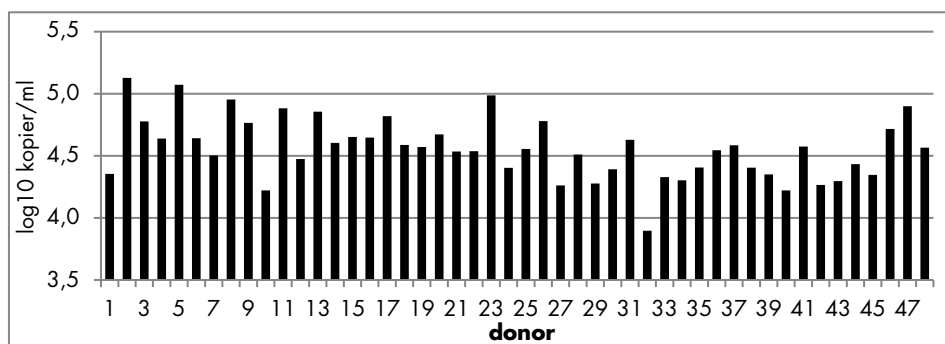
QIASymphony SP udfører alle trin i oprensningsproceduren. Der behandles op til 96 prøver i portioner af 24 i en enkelt kørsel. Urinprøver skal evt. forbehandles manuelt.

Bemærk: Ydelseskarakteristika afhænger i høj grad af forskellige faktorer og relaterer sig til den specifikke efterfølgende anvendelse. De er blevet fastlagt for QS DSP Circulating DNA Kit i forbindelse med typiske efterfølgende anvendelser. Metoder til isolering af nukleinsyrer fra biologiske prøver bruges dog som front-end for flere efterfølgende anvendelser, ydelsesparameter, for eksempel krydskontaminering, og kørselspræcision skal etableres for enhver sådan arbejdsgang som en del af udviklingen af den efterfølgende anvendelse. Derfor er det brugerens ansvar at validere hele arbejdsgangen for at etablere passende ydelsesparametre.

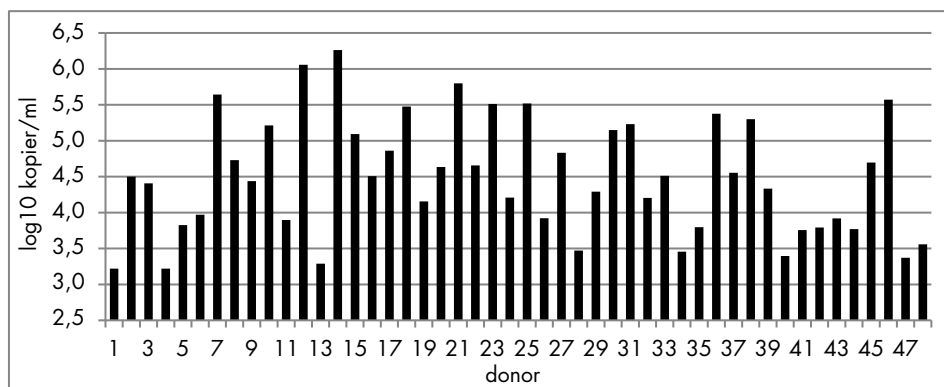
Grundydelse

Grundydelsen for QIASymphony DSP Circulating DNA Kit blev evalueret ved hjælp af 48 enkeltdonorer for ccfDNA-ekstrahering fra 4 ml Streck-plasma samt 4 ml stabiliseret urin. ccfDNA-udbyttet er blevet bestemt med en intern real-time PCR-analyse for 18S ribosomal RNA-kodningssekvensen.

Forskellen i udbytter (log₁₀ kopier/ml) i figur 1 (4 ml plasma) og figur 2 (4 ml urin) afspejler de stærke donorafhængige koncentrationer af ccfDNA, der typisk findes i samme volumen af det pågældende prøvemateriale.



Figur 1. ccfDNA-udbyttet fra plasma fra 48 enkeltdonorer. Der blev doneret blod fra 48 enkeltdonorer i Cell-Free DNA BCT (Streck). CcfDNA blev ekstraheret fra 4 ml plasma ved hjælp af QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. CcfDNA-udbyttet blev kvantificeret ved hjælp af en intern real-time PCR-analyse for 18S kodningssekvensen. Resultater blev beregnet som target-kopier pr. milliliter plasmainput.



Figur 2. ccfDNA-udbyttet fra urin fra 48 enkeltdonorer. Urin indsamlet fra 48 enkeltdonorer i Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck). CcfDNA blev ekstraheret fra 4 ml urin ved hjælp af QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. CcfDNA-udbyttet blev kvantificeret ved hjælp af en intern real-time PCR-analyse for 18S kodningssekvensen. Resultater blev beregnet som target-kopier pr. milliliter urininput.

Kørselspræcision

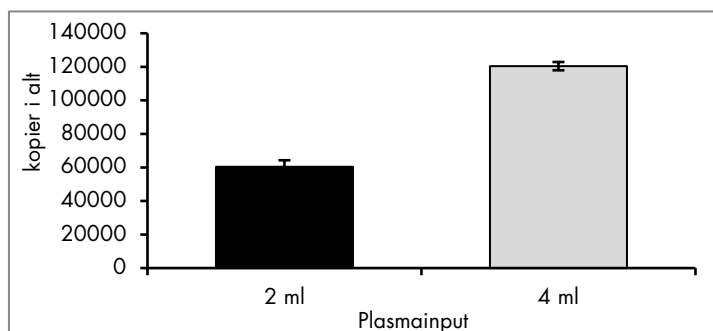
Variationskoefficienter (CV) blev bestemt til ekstraktion af humant ccfDNA fra EDTA-plasma. ccfDNA blev kvantificeret ved hjælp af en intern real-time PCR-analyse for 18S ribosomal kodningssekvensen i forbindelse med en præcisionsanalyse. Der blev i alt udført 10 QIASymphony-kørsler hver i 4 batches (8 replikater pr. batch). Præcisionsdataene vises i tabel 1.

Tabel 1. Analyse af præcisionskøn

Præcision	CV (%)
Inden for batch	11,67
Repeterbarhed	13,14
Laboratorienøjagtighed	13,14
Samlet præcision	14,12

Samme ydelse for 2- og 4-ml-protokoller

Samme ydelse for protokoller for 2- og 4-ml-prøveinput blev evalueret for QIASymphony DSP Circulating DNA Kit ved hjælp af endogent ccfDNA ekstraheret fra en human EDTA-plasmapulje. Der blev i alt udført 8 uafhængige QIASymphony-kørsler hver i 4 batches (8 replikater pr. batch). Det lineære område af QIASymphony DSP Circulating DNA Kit-proceduren er blevet bestemt for 18S kodningssekvensen med en intern real-time PCR-analyse (figur 3). Forskelsforholdet for 2- og 4 ml-protokollerne er vist i tabel 2 (Referenceprotokollen er 4 ml prøveinput).



Figur 3. Samme ydelse ved hjælp af protokollen med 2 og 4 ml prøveinput. ccfDNA-protokollens lineære område blev bestemt ved hjælp af 2- og 4-ml-protokoller. ccfDNA-udbyttet blev kvantificeret ved hjælp af en intern real-time PCR-analyse for 18S kodningssekvensen. Resultater blev beregnet som kopier i alt pr. protokol.

Tabel 2. Forskel mellem 2- og 4-ml-protokoller (N = 256)

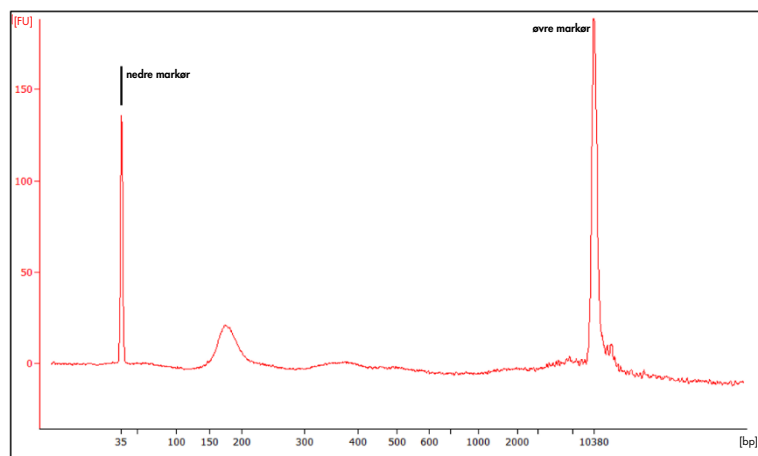
Parameter	Værdi
Skønnet forhold af geometrisk middelværdi i beregnede kopier/ml	1,01
Nedre 95 % konfidensgrænse	0,92
Øvre 95 % konfidensgrænse	1,11
Samlet præcision	14,12

Ydelsen for protokoller for 2 og 4 ml prøveinput er den samme, målt i beregnede kopier pr. milliliter.

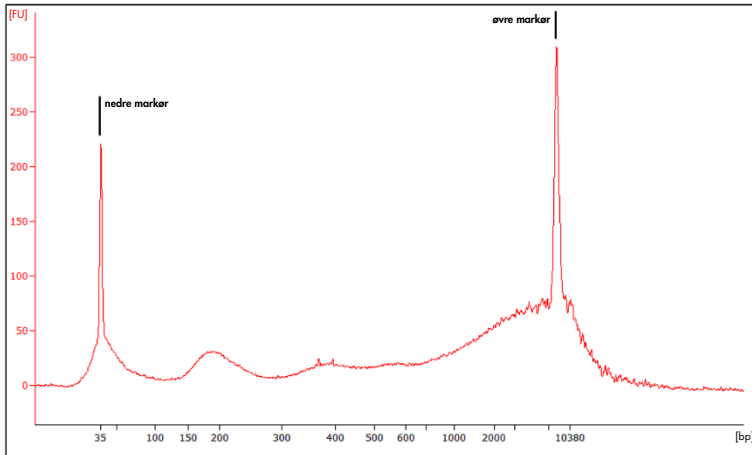
Størrelsesfordeling

For at vurdere prøveoutputtets størrelsesfordeling blev ccfDNA ekstraheret fra et prøveinput på 4 ml ved hjælp af QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, elueret i 75 µl, og derefter blev 1 µl eluat størrelsesanalyseret ved hjælp af Agilent® 2100 Bioanalyzer og en Agilent High Sensitivity DNA Chip. Der blev udført i alt 5 uafhængige replikater. Der vises en repræsentativ DNA-profil for plasma i figur 4 og for urin i figur 5.

Elektroferogrammet for plasma i figur 4 viser den hyppigt observerede spidsværdi ved cirka 165 bp, der går fra 145 til 196 bp, hvilket er i længdeområdet for det histonbundne DNA i nukleosomet. Elektroferogrammet for urin i figur 5 viser, at den fortrinsvise spidsværdi ved cirka 160 bp er bredere, idet den går fra cirka 145 til 250 bp. Dertil kommer, at der for urin er endnu en spidsværdi, der går cirka 20 til 100 bp (ved den nedre markørs spidsværdi), hvilket er tegn på en ccfDNA-fraktion med en højere fragmenteringsgrad. Figur 5 viser desuden et højt antal lange DNA-fragmenter fra cirka 2 kb. Et højt antal af disse genome DNA-fragmenter, der ofte ses i urinprøver, skyldes højest sandsynligt frigivelse af genomt DNA fra celler, der er til stede i urinen.



Figur 4. Størrelsesfordeling af ccfDNA fra plasma (Bioanalyzer-profil). ccfDNA'et blev ekstraheret fra 4 ml EDTA-plasma ved hjælp af QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. 1 µl eluat blev udsat for en Agilent High Sensitivity DNA Chip-analyse. x-akse: baseparstørrelse(bp); y-akse: fluorescensenheder (FE).

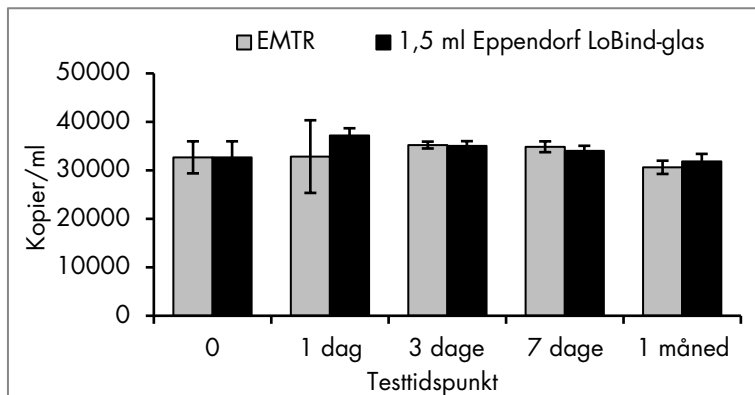


Figur 5. Størrelsesfordeling af ccfDNA fra urin (Bioanalyser-profil). ccfDNA'et blev ekstraheret fra 4 ml urin ved hjælp af QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. 1 µl eluat blev udsat for en Agilent High Sensitivity DNA Chip-analyse. x-akse: baseparstørrelse(bp); y-akse: fluorescensenheder (FE).

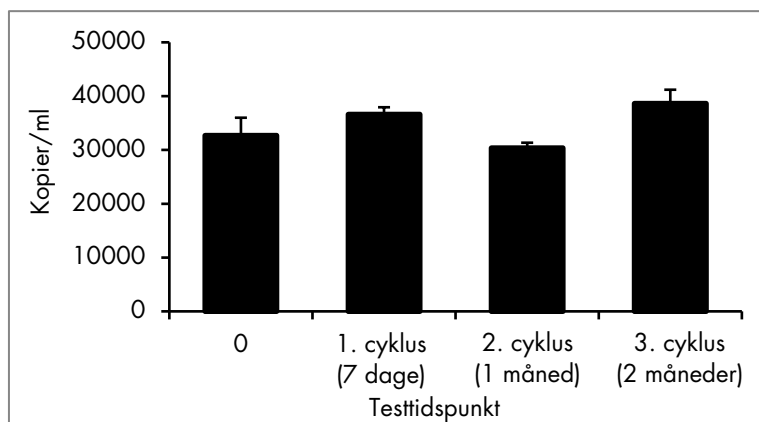
Eluatstabilitet

Eluat-stabilitet for QIASymphony DSP Circulating DNA Kit blev vurderet ved hjælp af ekstraheret ccfDNA fra en human EDTA-plasmapulje. Eluater blev opbevaret i 2 forskellige elueringsrackformater: QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; kat.nr. 19588) og 1,5 ml Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock-glas. Eluater blev analyseret i replikater af 8. DNA's stabilitet i eluater blev bestemt med en intern real-time PCR-analyse for 18S ribosomal RNA-kodningssekvens.

Eluatstabiliteten ved 2-8 °C blev ikke berørt af opbevaringsperioden på op til én måned eller af opbevaringsformatet (figur 6). DNA's stabilitet i LoBind-glas blev ikke berørt af opbevaring ved -15 °C til -30 °C, der omfattede 3 fryse-tø-cykluser efter 7 dage, én måned og to måneder (figur 7).



Figur 6. ccfDNA's stabilitet i eluater, der opbevares ved 2-8 °C i 2 glasformater. ccfDNA'et blev ekstraheret fra EDTA-plasma ved hjælp af QIASymphony DSP Circulating DNA Kit og opbevaret ved 2-8 °C til forskellige testtidspunkter. ccfDNA-udbyttet blev kvantificeret ved hjælp af en intern real-time PCR-analyse for 18S kodningssekvensen. Resultater blev beregnet som target-kopier pr. milliliter plasmainput.



Figur 7. ccfDNA's stabilitet i eluater, der opbevares ved -15 °C til -30 °C, inkl. 3 fryse-tø-cykler. ccfDNA'et blev ekstraheret fra EDTA-plasma ved hjælp af QIASymphony DSP Circulating DNA Kit og opbevaret ved -15 °C til -30 °C i 1,5 ml Eppendorf LoBind-glas. ccfDNA-udbyttet blev bestemt ved 3 testtidspunkter ved hjælp af samme eluat ved 3 fryse-tø-cykler. ccfDNA-udbyttet blev kvantificeret ved hjælp af en intern real-time PCR-analyse for 18S kodningssekvensen. Resultater blev beregnet som target-kopier pr. milliliter plasmainput.

Interfererende stoffer

Humant plasma og human urin fik tilsat forskellige potentielle interfererende stoffer (se tabel 3) for at teste deres indvirkning på ccfDNA-ekstraktionsydelsen af QS DSP Circulating DNA Kit og efterfølgende kompatibilitet med typiske efterfølgende analyser. Eluater blev analyseret med en intern real-time PCR-analyse for 18S kodningssekvensen og med Qubit® Fluorometer ved hjælp af en High Sensitivity dsDNA-analyse.

Tabel 3. Testkoncentrationer af potentielt interfererende stoffer

Interfererende stoffer	Plasma	Urin
Bilirubin	200 mg/liter*	200 mg/liter*
Hæmoglobin	2 g/liter [†]	-
BSA og gammaglobin	Op til 120 g/liter*	1 g/liter [†]
Triglycerider	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

[†] FDA Draft Guidance (11.05.2011)

Ingen af de stoffer, der er anført i tabel 3 interfererer, undtagen plasmaprøver med høje koncentrationer af gammaglobulin (>30 g/l), som kan medføre reduceret genfindning af cirkulerende cellefrit DNA.

Bemærk: Testning blev udført under anvendelse af typiske efterfølgende anvendelser med henblik på en vurdering af kvaliteten af de ekstraherede nukleinsyrer. Forskellige efterfølgende anvendelser kan dog have forskellige krav med hensyn til renhed (dvs. fravær af potentielle interfererende stoffer), så identifikation og testning af relevante stoffer skal også etableres som en del af udviklingen af den efterfølgende anvendelse for enhver arbejdsgang, der involverer QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

Krydskontaminering

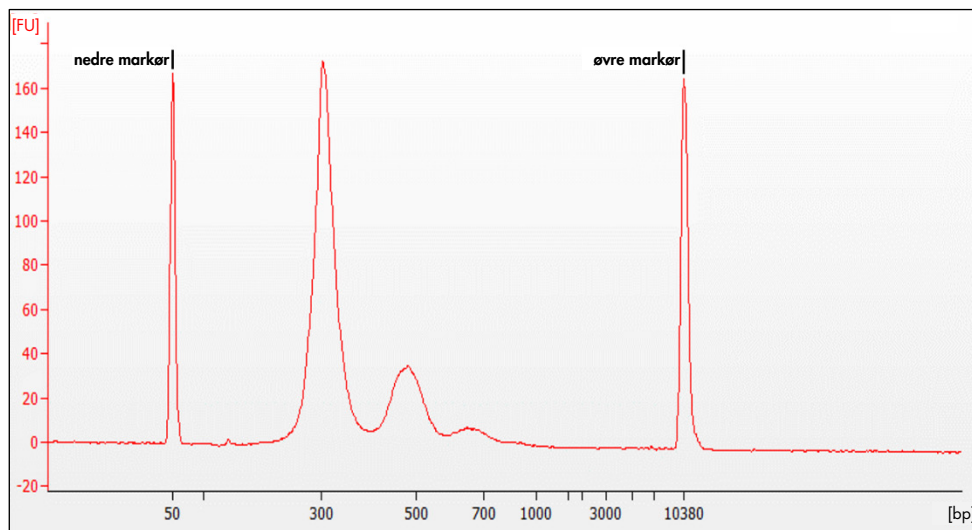
Risikoen for krydskontaminering af QIAasymphony DSP Circulating DNA-systemet blev analyseret ved at udføre tre 96-prøves kørsler på QIAasymphony SP-instrumentet med skiftende batches i skakbrætmønster (skiftevis positive og negative prøver). Plasma fra kvinder (negativ prøve) og plasma fra kvinder tilsat afklippet mandlig gDNA med en koncentration på $1,0E+05$ kopier af SRY1-gen pr. milliliter plasma (positiv prøve) blev brugt som prøvemateriale til et modelsystem. Klargøring af prøve blev udført under anvendelse af 4-ml-protokollen, der inkluderer to separate prøveoverførsler et volumen på 2 ml hver. En potentiel kontaminering af de negative plasmaprøver fra kvinder under ekstraktionskørslerne blev evalueret ved efterfølgende analyse af eluaterne ved anvendelse af en real-time PCR for det Y-kromosomspecifikke gen SRY1.

Der blev ikke detekteret nogen krydskontaminering for overførsel fra prøve til prøve, batch til batch eller kørsel til kørsel.

Kompatibilitet med efterfølgende anvendelser

Typiske efterfølgende anvendelser blev brugt under udviklingen af QIAasymphony DSP Circulating DNA Ki for at demonstrere, at de isolerede nukleinsyrer er kompatible med en lang række forskellige teknologier til efterfølgende anvendelser, herunder real-time PCR (se figur 1, figur 2, figur 3, figur 6 og figur 7), Qubit Fluorometer (proteinanalyse og dsDNA-analyse med høj sensitivitet), bibliotek (se figur 8) og Next Generation Sequencing (NGS).


















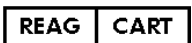
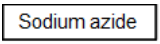
Elektroferogrammet i figur 8 viser et eksempel på en vellykket adapterligering og efterfølgende amplifikation af ccfDNA. Ved siden af den fremtrædende spidsværdi ved 300 bp for det nukleosomale ccfDNA (ca. 165 plus ca. 70 bp for hver adapter) er den di-nukleosomale spidsværdi ved ca. 470 bp også synlig.



Figur 8. DNA-bibliotek for ccfDNA (enkelt donor), der er ekstraheret med QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit. ccfDNA'et blev ekstraheret fra Streck-plasma ved hjælp af 4-ml-protokollen, og efterfølgende blev 35 μ l eluat overført til NEBNext[®] Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs). Efter amplifikation og AMPure XP-oprensning blev 1 μ l eluat analyseret med Agilent 7500 DNA Kit.

Symboler

Følgende symboler findes i brugsanvisningen på emballagen og etiketten:

Symbol	Symboldefinition
	Indeholder tilstrækkeligt med reagenser til <N>-reaktioner
	Holdbarhedsdato
	Dette produkt opfylder kravene i EU-direktivet 2017/746 for medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik.
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialenummer (dvs. etiketten på komponenten)
	Komponenter
	Indeholder
	Antal
	Globalt handelsvarenummer
Rn	R står for revision af brugsanvisningen, og n står for revisionsnummeret
	Temperaturbegrænsning
	Producent
	Læs brugsanvisningen
	Advarsel/forsigtig
	Proteinase K
	Brøndnummer (dvs. brønd i reagenspatron)
	Reagenspatron
	Natriumazid

Symbol

Symboldefinition

EtOH

Ethanol

UDI

Entydig instrumentidentifikator

Revisionshistorik

Revision	Beskrivelse
R1, juni 2022	<p>Version 2, revision 1</p> <ul style="list-style-type: none">• Opdatering til version 2 for overholdelse af IVDR• Tilføjet afsnit om forstyrrende stoffer, krydskontaminering og kompatibilitet med efterfølgende anvendelser

Opdaterede licensoplysninger og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser findes i håndbogen eller brugsvejledningen til det pågældende QIAGEN-kit. Håndbøger og brugsvejledninger til QIAGEN-kits kan fås via www.qiagen.com eller rekvireres hos QIAGEN Teknisk Service eller den lokale distributør.

Varemærker: 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 dets datterselskaber). Registrerede navne, varemærker osv., der bruges i dette dokument, er beskyttet af den relevante lovgivning, også når de ikke er specifikt markeret som sådan.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

Denne side skal være tom

