

Februari 2017

QIAsymphony[®] DSP Circulating DNA-kit

Werkingseigenschappen

IVD

CE

MAT

937556

Inhoudsopgave

Werkingseigenschappen	4
Basiswerking.....	4
Nauwkeurigheid van de run	6
Gelijkwaardige werking van protocollen voor 2 ml en voor 4 ml	6
Lengteverdeling	7
Stabiliteit van het eluaat	9

Het QIASymphony DSP Circulating DNA-systeem is een gebruiksklaar *in vitro* systeem voor de kwalitatieve opzuivering van humaan circulerend celvrij DNA (ccfDNA) uit humane 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 levert reagentia voor de volledig geautomatiseerde en gelijktijdige opzuivering van humaan ccfDNA uit een breed scala aan humane plasmatypes (met EDTA of citraat als antistollingsmiddel, en plasma uit afnamebuizen met gestabiliseerd ccfDNA) en humane urine (gestabiliseerd en niet-gestabiliseerd). De werkingseigenschappen zijn niet voor elke bloedafnamebuis vastgesteld; deze moeten door de gebruiker gevalideerd worden.

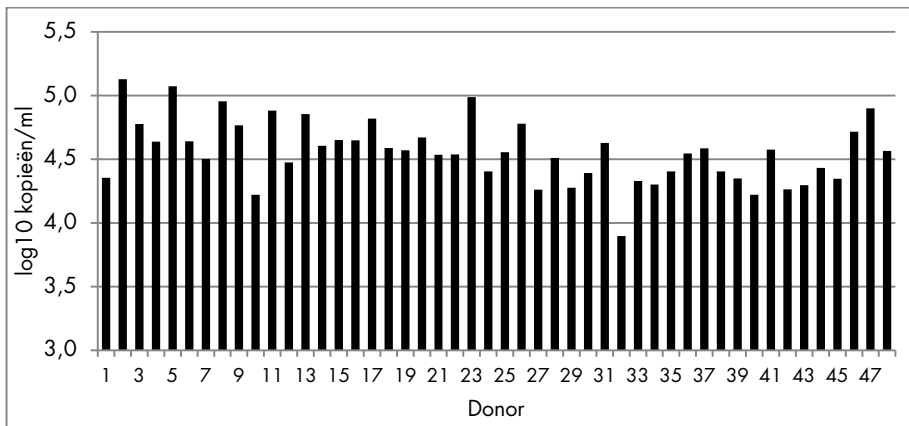
Het opgezuiverde ccfDNA kan in een breed scala aan downstream toepassingen gebruikt worden. De QIASymphony SP voert alle stappen van de opzuiveringsprocedure uit. In één run kunnen maximaal 96 monsters, in batches van 24, worden verwerkt. Het kan nodig zijn om urinemonsters handmatig voor te behandelen.

Werkingseigenschappen

Basiswerking

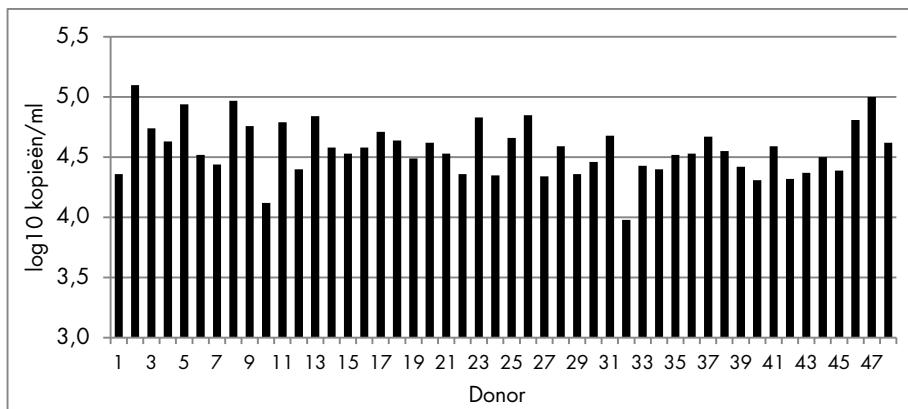
De basiswerking van de QIASymphony DSP Circulating DNA-kit is geëvalueerd met 48 donoren, waarbij ccfDNA werd geëxtraheerd uit 4 ml gestabiliseerd plasma, 4 ml EDTA-plasma en 4 ml gestabiliseerde urine. De opbrengst aan ccfDNA werd bepaald met een real-time PCR-assay van het eigen laboratorium, op basis van de coderende sequentie van 18S-ribosomaal RNA.

Het verschil in opbrengsten (\log_{10} kopieën/ml) in afbeelding 1 (4 ml gestabiliseerd plasma), afbeelding 2 (4 ml EDTA-plasma) en afbeelding 3 (4 ml gestabiliseerde urine) weerspiegelt de sterke donor-afhankelijke concentraties ccfDNA die doorgaans in hetzelfde volume van de respectievelijke monstermaterialen worden gevonden. De opbrengsten aan ccfDNA uit gestabiliseerd plasma en EDTA-plasma vertonen een sterke correlatie voor de 48 donoren bij gebruik van plasma uit twee verschillende typen bloedafnamebuizen (afbeelding 1 en afbeelding 2).

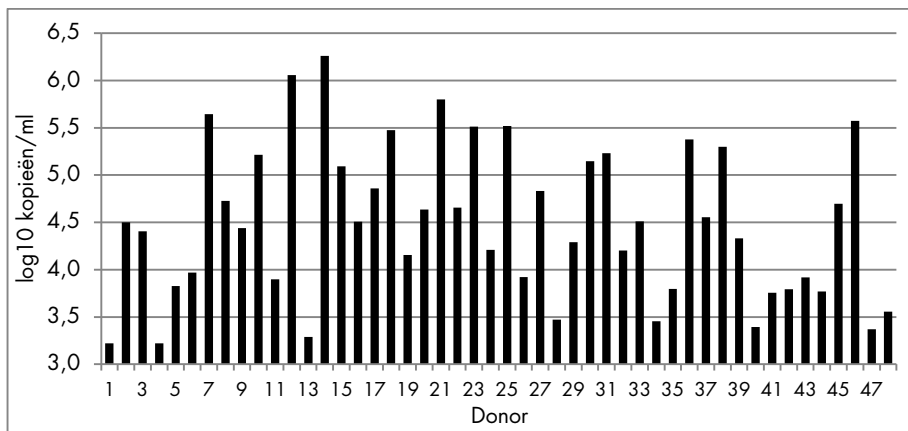


Afbeelding 1. Opbrengst aan ccfDNA uit plasma van 48 donoren: bloedafnamebuizen voor gestabiliseerd ccfDNA. Van 48 donoren werd bloed afgenomen in bloedafnamebuizen voor gestabiliseerd ccfDNA. Het

ccfDNA werd geëxtraheerd uit 4 ml plasma met de QIASymphony DSP Circulating DNA-kit, en 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 ml ingevoerd plasma.



Afbeelding 2. Opbrengst aan ccfDNA uit plasma van 48 donoren: EDTA-bloedafnamebuizen. Van 48 donoren werd bloed afgenomen in EDTA-bloedafnamebuizen. Het ccfDNA werd geëxtraheerd uit 4 ml plasma met de QIASymphony DSP Circulating DNA-kit, en 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 ml ingevoerd plasma.



Afbeelding 3. Opbrengst aan ccfDNA uit gestabiliseerde urine van 48 donoren. Van 48 donoren werd urine direct na afname gestabiliseerd. Het ccfDNA werd geëxtraheerd uit 4 ml urine met de QIASymphony

DSP Circulating DNA-kit, en 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 ml ingevoerde urine.

Nauwkeurigheid van de run

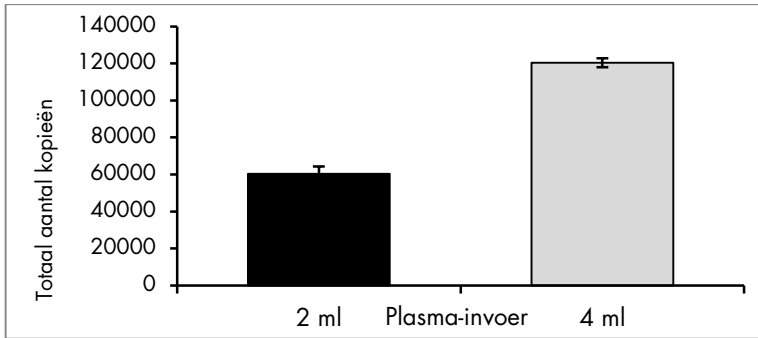
Variatiecoëfficiënten (VC's) werden bepaald voor de extractie van humaan ccfDNA uit EDTA-plasma. Voor analyse van de nauwkeurigheid werd ccfDNA gekwantificeerd met een real-time PCR-assay van het eigen laboratorium, op basis van de coderende sequentie van 18S-ribosomaal RNA. In totaal werden 10 QIAAsymphony-runs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

Tabel 1. Analyse van schattingen van de nauwkeurigheid

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

Gelijkwaardige werking van protocollen voor 2 ml en voor 4 ml

De gelijkwaardige werking van protocollen voor 2 ml en voor 4 ml monsterinvoer is geëvalueerd voor de QIAAsymphony DSP Circulating DNA-kit met gebruik van endogeen ccfDNA, geëxtraheerd uit een humane EDTA-plasmapool. In totaal werden 8 onafhankelijke QIAAsymphony-runs uitgevoerd, elk in 4 batches met 8 replica's per batch. Het lineaire bereik van de procedure voor de QIAAsymphony DSP Circulating DNA-kit werd bepaald voor de coderende sequentie van 18S-rRNA, met een real-time PCR-assay van het eigen laboratorium (afbeelding 4). De ratio van het verschil tussen de protocollen voor 2 ml en 4 ml wordt weergegeven in tabel 2. (Het referentieprotocol is 4 ml monsterinvoer).



Afbeelding 4. Gelijkwaardige werking bij gebruik van de protocollen voor 2 ml en 4 ml monsterinvoer
 Het lineair bereik van het ccfDNA-protocol werd bepaald met 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 de protocollen voor 2 ml en 4 ml (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

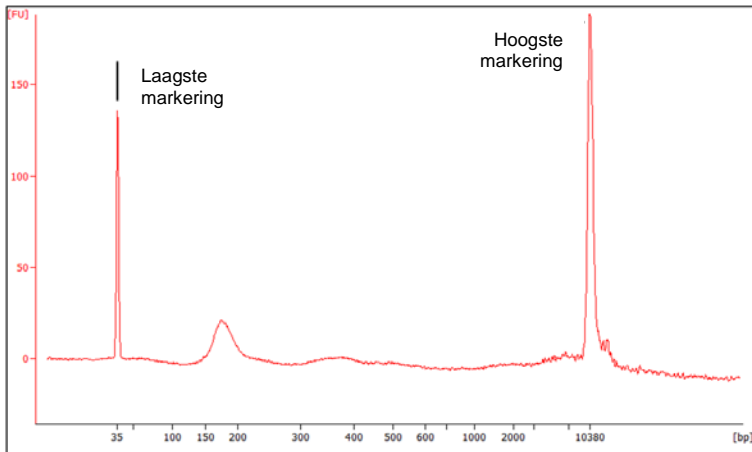
De werking van de protocollen voor 2 ml en 4 ml monsterinvoer is gelijkwaardig, gemeten als het berekende aantal kopieën/ml.

Lengteverdeling

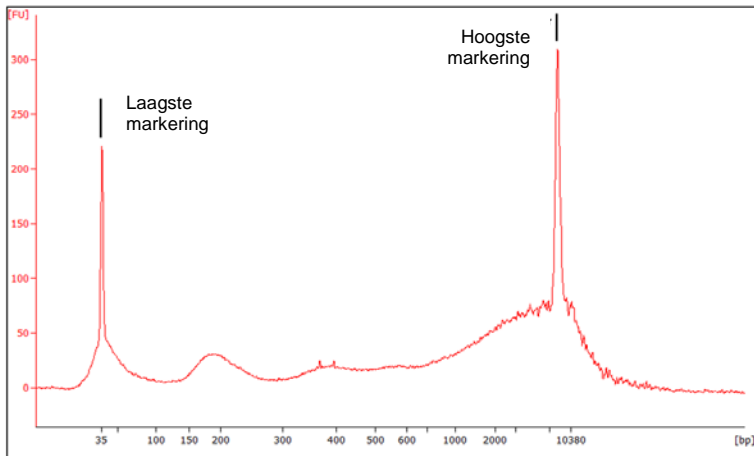
Om de lengteverdeling van de monsteruitvoer te evalueren, werd ccfDNA uit een monsterinvoer van 4 ml geëxtraheerd met de QIASymphony DSP Circulating DNA-kit, geëluëerd in 75 µl, en vervolgens werd 1 µl van het eluaat onderworpen aan lengteanalyse met de Agilent 2100 Bioanalyzer met gebruik van een Agilent High Sensitivity DNA-chip. In

totaal werden 5 onafhankelijke replica's uitgevoerd. Een representatief DNA-profiel wordt voor plasma weergegeven in afbeelding 5, en voor gestabiliseerde urine in afbeelding 6.

Het elektroferogram voor plasma in afbeelding 5 vertoont de vaak waargenomen piek bij ~ 160 bp, tussen 145 bp en 196 bp, hetgeen binnen het bereik van de lengte van het histongebonden DNA in het nucleosoom ligt. Het elektroferogram voor urine in afbeelding 6 laat zien dat de belangrijkste piek bij ~ 160 bp breder is, tussen ~ 145 bp en 250 bp. Daarnaast is voor urine een tweede piek aanwezig tussen ~ 20 bp en 100 bp (ter hoogte van de laagste markeringspiek). Deze piek geeft een ccfDNA-fractie met een hogere mate van fragmentatie aan. Bovendien laat afbeelding 6 een groot aantal lange DNA-fragmenten van ~ 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 5. Lengteverdeling van ccfDNA uit plasma (Bioanalyzer-profiel). Het ccfDNA werd geëxtraheerd uit 4 ml EDTA-plasma met de QIA Symphony DSP Circulating DNA-kit; 1 μ l eluaat werd geanalyseerd met een Agilent High Sensitivity DNA-chip. X-as: basepaarlengte (bp); Y-as: fluorescentie-eenheden (FU).

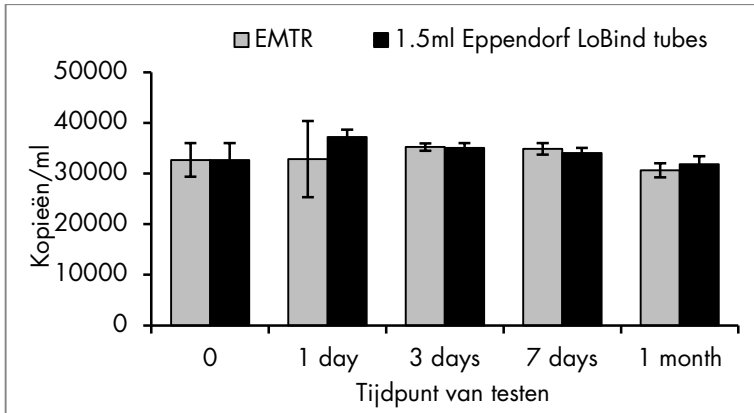


Afbeelding 6. Lengteverdeling van ccfDNA uit urine (Bioanalyser-profiel). Het ccfDNA werd geëxtraheerd uit 4 ml gestabiliseerde urine met de QIASymphony DSP Circulating DNA-kit; 1 µl eluaat werd geanalyseerd met een Agilent High Sensitivity DNA-chip. X-as: basepaarlengte (bp); Y-as: fluorescentie-eenheden (FU).

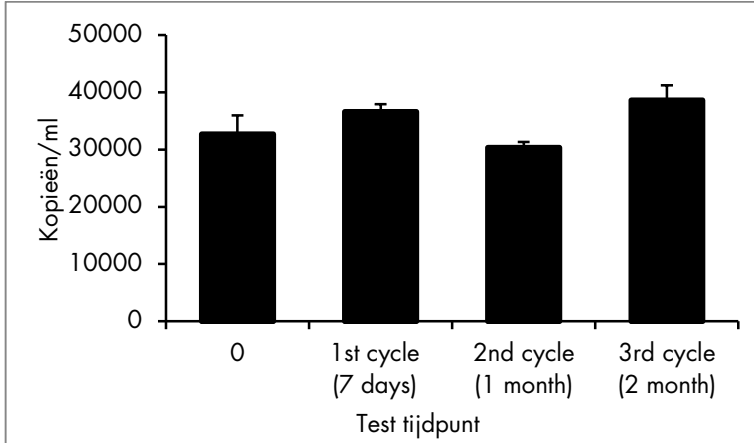
Stabiliteit van het eluaat

De stabiliteit van het eluaat is geëvalueerd voor de QIASymphony DSP Circulating DNA-kit met gebruik van uit een humane EDTA-plasmapool geëxtraheerd ccfDNA. Eluaten werden bewaard in elutierекken met 2 verschillende formaten: QIAGEN EMTR (Elution Microtubes CL 96; cat. nr. 19588) en 1,5 ml Eppendorf® LoBind Snap Cap Safe-Lock tubes. De eluaten werden in 8-voud geanalyseerd. 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 negatief beïnvloed door de duur van de bewaarperiode tot maximaal één maand of door het formaat van het elutiereк (afbeelding 7). De stabiliteit van DNA in LoBind-buizen werd niet negatief beïnvloed door bewaring bij –15 tot –30 °C met 3 cycli van invriezen-ontdooien, na 7 dagen, één maand en twee maanden (afbeelding 8).



Afbeelding 7. Stabiliteit van ccfDNA in eluaten die zijn bewaard bij 2–8 °C in 2 buizenformaten. Het ccfDNA werd geëxtraheerd uit EDTA-plasma met de QIA Symphony DSP Circulating DNA-kit en bewaard bij 2–8 °C voor verschillende tijdpunten van testen. 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 ml ingevoerd plasma.



Afbeelding 8. Stabiliteit van ccfDNA in eluaten die zijn bewaard bij –15 tot –30 °C, met 3 cycli van invriezen-ontdooien. Het ccfDNA werd geëxtraheerd uit EDTA-plasma met de QIA Symphony DSP Circulating DNA-kit en bewaard bij –15 tot –30 °C, in 1,5 ml Eppendorf LoBind-buizen. De opbrengst aan ccfDNA werd op 3 testtijdpunten bepaald door hetzelfde eluaat te gebruiken in 3 cycli van invriezen-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 ml ingevoerd plasma.

Raadpleeg voor bijgewerkte licentie-informatie en productspecifieke disclaimers het desbetreffende handboek van de QIAGEN-kit of de gebruikershandleiding. Handboeken van QIAGEN-kits en gebruikershandleidingen zijn beschikbaar op www.qiagen.com of kunnen worden opgevraagd bij de afdeling QIAGEN Technical Services of uw lokale QIAGEN-vestiging.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Eppendorf® (Eppendorf AG).

Gedeponeerde namen, handelsmerken, enz. die in dit document worden gebruikt, ook al zijn deze niet specifiek als zodanig aangeduid, mogen niet als niet wettelijk beschermd worden beschouwd.

02/2017 HB-2309-D01-001

© 2017 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

Bestellen www.qiagen.com/shop | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com
