




Prestatiekenmerken

QIAamp® DSP Circulating NA Kit, versie 1 **REF** 61504

Versiebeheer

  	Controleer voordat u een test gaat uitvoeren of er nieuwe (herziene) elektronische bijsluiters beschikbaar zijn op www.qiagen.com , onder het productnummer en de hulpbronnen voor het product.
---	--

Algemene inleiding

De QIAamp DSP Circulating NA Kit is een systeem voor isolatie en zuivering van circulerend celvrij (circulating cell-free, ccf) DNA and RNA uit menselijke bloedplasmamonsters met behulp van silicamembraan-technologie (QIAamp-technologie).

Het product is bedoeld voor toepassing door beroepsmatige gebruikers, bijvoorbeeld analisten en artsen die zijn opgeleid in molecuair-biologische technieken.

De QIAamp DSP Circulating NA Kit is bedoeld voor in vitro-diagnostiek.

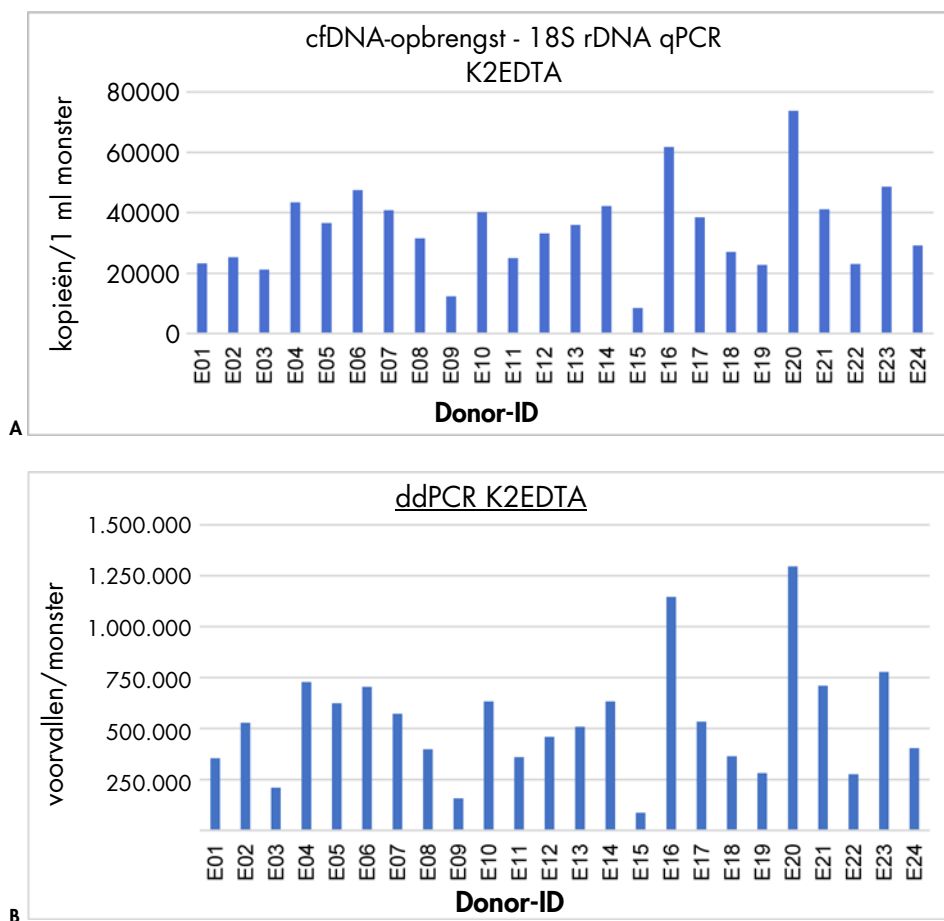
Opbrengst van gezuiverde nucleïnezuren (NZ)

Plasmamonsters kunnen een hoge variantie vertonen wat betreft de opbrengst van gezuiverde nucleïnezuren. Daarom dienen de gebruikers het invoer- en elutievolume van het plasma te optimaliseren voor de specifieke beoogde toepassing en vervolgpcedures in hun laboratorium.

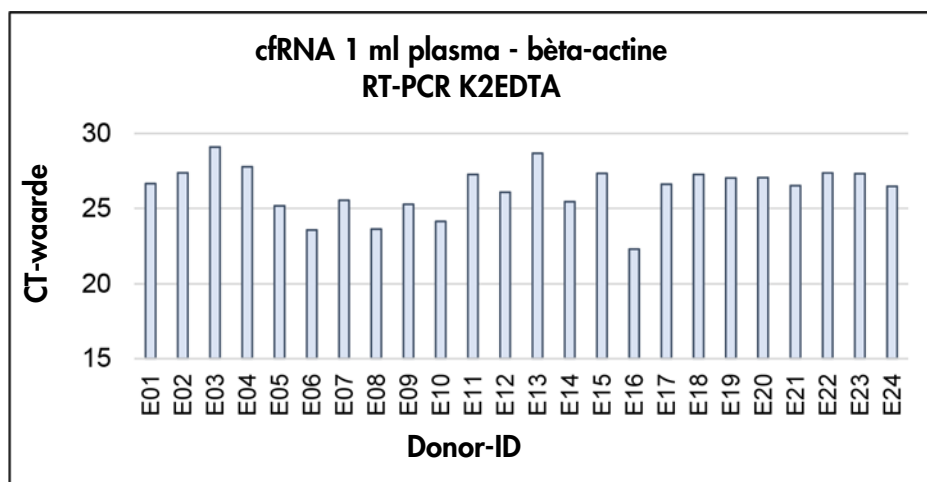
Als de kit wordt gebruikt in combinatie met een kit of ander hulpmiddel van QIAGEN® voor verdere verwerking of analyse, raadpleeg dan de instructies in de betreffende handleiding.

Analyse van vervolgpcedures

Nucleïnezuren die zijn geïsoleerd met behulp van de QIAamp DSP Circulating NA Kit zijn gereed voor gebruik in verschillende vervolgpcedures. Voor een prestatiebeoordeling zijn de nucleïnezuren uit single-donor menselijk bloedplasma geïsoleerd met gebruik van drie verschillende bloedafnamebuisjes (BD Vacutainer® K2EDTA Tube, Becton Dickinson®; PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX; en Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®, Streck; met elk n=24 donoren). Eluaten uit 1 ml plasma-invoer zijn getest aan de hand van kwantitatieve PCR (quantitative PCR, qPCR, Afbeelding 1A), digitale druppel-PCR (digital droplet PCR, ddPCR, Afbeelding 1B) en omgekeerde transcriptie-qPCR (reverse transcription qPCR, RT-qPCR) voor RNA (alleen plasma in BD Vacutainer K2EDTA Tube, Afbeelding 2).



Afbeelding 1. Vergelijking van single-donor plasma (1 ml invoer) tussen qPCR en ddPCR (Bio-Rad®)



Afbeelding 2. Detectie van celvrij RNA in single-donor plasma (1 ml invoer) aan de hand van een omgekeerde transcriptie-qPCR-assay voor het menselijk gen voor bèta-actine (fragmentlengte van 293 bp).

Voor een NGS-analyse (Next Generation Sequencing) zijn eluaten gegenereerd uit een involume van 5 ml plasma (BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube en Streck Cell-Free DNA BCT; elk n=8 donoren). De totale DNA-opbrengst voor 5 ml plasma varieerde tussen 50-150 ng DNA, gedetecteerd met de Qubit® HS dsDNA-assay. De NGS-analyse is uitgevoerd aan de hand van de GeneRead® QIAact Actionable Insights Tumor Panel en het GeneReader™-systeem. Alle monsters werden met succes verrijkt en er werden bibliotheken aangelegd. >98% van de gegenereerde resultaten zijn in kaart gebracht op het menselijk genoom en >99,8% van de posities in de interessegebieden hadden een basisdekking van $\geq 500\times$.

Voor beide soorten nucleïnezuur (DNA en RNA) werd geslaagde toepassing van vervolgtechnologieën aangetoond (Afbeelding 3).

	qPCR	ddPCR	RT-qPCR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
PAXgene	✓	✓	niet getest	✓
Streck	✓	✓	niet getest	✓

Afbeelding 3. Geslaagd gebruik van geïsoleerde nucleïnezuuren met verschillende vervolgprocedures.

De gebruiker dient het invoer- en elutievolume van het plasma voor de doelmoleculen en eventuele daaropvolgende procedures in hun laboratorium te optimaliseren. Of raadpleeg de specifieke prestaties van de betreffende vervolgprocedure.

Stabiliteit van het eluaat

De stabiliteit van het eluaat is afhankelijk van de samenstelling en het soort geïsoleerde nucleïnezuuren, het elutievolume en de opslagomstandigheden. Wij raden gebruikers aan de stabiliteit van het eluaat te bepalen volgens hun specifieke vereisten.

De stabiliteit van het eluaat is getest voor DNA en eluaten afkomstig uit menselijk plasma gegenereerd uit BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson) en stabiliserende bloedafnamebuisjes (PAXgene Blood ccfDNA Tube en Streck Cell-Free DNA BCT). De eluaten werden bewaard bij -30 tot -15 °C en -90 tot -65 °C. Er werd gedurende 12 maanden geen achteruitgang waargenomen. Eluaten die werden bewaard bij 2-8 °C en bij kamertemperatuur (15-25 °C) waren stabiel gedurende 48 uur. Alle omstandigheden werden beoordeeld aan de hand van qPCR gericht op het menselijke 18S rDNA-gen.

De stabiliteit van het eluaat is getest voor RNA en eluaten afkomstig uit menselijk plasma gegenereerd uit BD Vacutainer K2EDTA Tubes (Becton Dickinson). De eluaten werden bewaard bij -30 tot -15 °C en -90 tot -65 °C. Er werd gedurende 6 maanden geen achteruitgang waargenomen. Eluaten die werden bewaard bij 2-8 °C waren stabiel gedurende 48 uur. Alle omstandigheden werden beoordeeld aan de hand van RT-qPCR gericht op het menselijke gen voor bèta-actine.

Als de kit wordt gebruikt in combinatie met een kit of ander hulpmiddel van QIAGEN voor verdere verwerking of analyse, raadpleeg dan de instructies in de handleiding van de betreffende kit.

Precisie van NZ-isolatie

De precisie is beoordeeld met gebruik van menselijk plasma en de omstandigheden zijn geëvalueerd aan de hand van qPCR gericht op het menselijke 18S rDNA-gen.

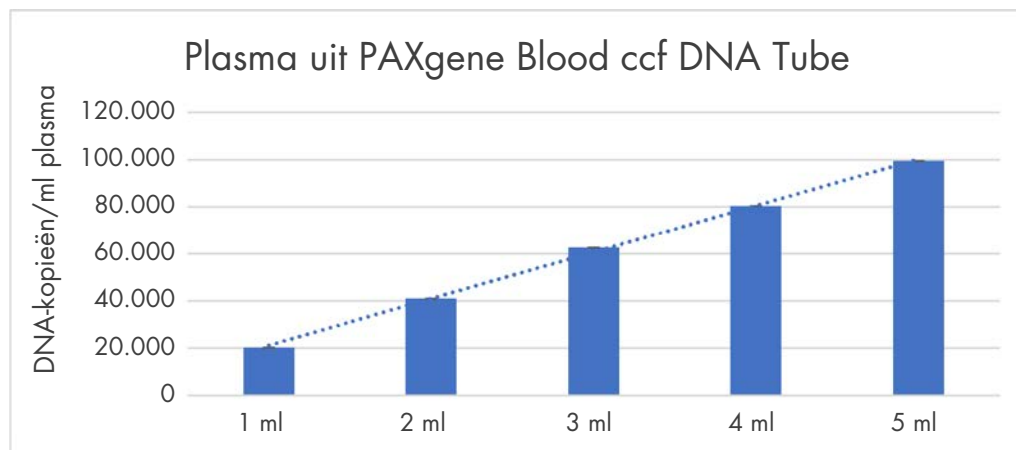
De opstelling van de proef bestond uit 12 zuiveringsruns met elk 12 herhalingen (totaal 144 zuiveringen). De zuiveringsruns werden uitgevoerd door drie verschillende gebruikers op drie verschillende dagen met drie verschillende instrumenten en drie verschillende partijen van de QIAamp DSP Circulating NA Kit. De standaarddeviatie (Standard Deviation, SD) en variatiecoëfficiënt (Coefficient of Variation, CV) werden vastgesteld voor elke parameter en voor de totale variabiliteit van de QIAamp DSP Circulating NA Kit (Tabel 1).

Tabel 1. Resultaten van precisieonderzoek

Parameter	Precisie		
	Gemiddeld aantal kopieën/ml	SD	CV (%)
Per run	25894	461	1,78
Per gebruiker		1392	5,38
Per instrument		228	0,88
Per dag		2096	8,09
Per partij		969	3,74
Totaal		3120	12,05

Lineariteit

Er zijn gegevens gegenereerd voor een plasma-invoervolume van 1-5 ml uit bloed dat werd bewaard in BD Vacutainer K2EDTA Tubes, PAXgene Blood ccfDNA Tubes en Streck Cell-Free DNA BCT's. Voor alle BCT's werd een lineaire toename van de DNA-opbrengst waargenomen (zie Afbeelding 4); voor BD Vacutainer K2EDTA Tubes was dit ook het geval voor RNA.



Afbeelding 4. Lineaire toename van totale DNA-opbrengst (DNA-kopieën/ml plasma-invoer) voor verschillende plasma-invoervolumes. Gegevens voor plasma gegenereerd uit PAXgene Blood ccfDNA Tube afgebeeld, equivalente resultaten voor plasma afkomstig uit BD Vacutainer K2EDTA Tube (DNA/RNA) en Streck Cell-Free DNA BCT.

Equivalentie van protocol (Breeze/Classic-protocollen)

De prestatie-equivalentie tussen het Breeze-protocol en het Classic-protocol is vastgesteld door aan te tonen dat de bijbehorende 95%-betrouwbaarheidsgrens van het verschil in gemiddelde Ct-waarde (RNA) of gemiddeld aantal kopieën/ml (DNA) binnen $\pm 2 \times \text{SD}$ viel. Daarbij is SD de waargenomen precisie van het Classic-protocol (referentieconditie). Er werden drie kitpartijen gebruikt en de proeven werden door drie gebruikers uitgevoerd.

De totale precisie (SD) van de gegenereerde Ct-waarden voor het Breeze-protocol was minder dan de bovengrens van het tweezijdige voorspellingsinterval van 95% voor de totale precisie (SD) van het Classic-protocol. Hierbij is het voorspellingsinterval in het onderzoek berekend met behulp van de gegevens uit het Classic-protocol ($n=143$) en met behulp van het aantal gegevenspunten voor het Breeze-protocol ($n=144$) in het onderzoek.

Interfererende stoffen

Uit verschillende bronnen kunnen mogelijk interfererende stoffen afkomstig zijn. Voorbeelden hiervan zijn natuurlijke omzettingsproducten, stoffen die tijdens de behandeling van de patiënt worden geïntroduceerd of stoffen die door de patiënt zijn ingenomen. Voor de QIAamp DSP Circulating NA Kit zijn hemoglobine, triglyceriden, EDTA, cafeïne, albumine, geconjugeerde bilirubine en ongeconjugeerde bilirubine getest als endogene samenstellingen. Er is geen interferentie waargenomen bij gebruik van qPCR als vervolgpprocedure. Bovendien is er geen interferentie geobserveerd door componenten van de QIAamp DSP Circulating NA Kit (proteïnase K, Buffer ACL, Buffer ACB, Buffer ACW1, Buffer ACW2 en ethanol) tijdens de monsterverwerking en de nucleïnezuurextractie.

Vanwege de complexiteit van mogelijk interfererende stoffen en verschillen in de gevoeligheid van specifieke vervolprocessen en -procedures, raden wij gebruikers aan het specifieke effect van interfererende stoffen voor hun eigen workflow te bepalen en een methode om verstoring tegen te gaan in hun specifieke diagnostische vervolpprocedure te valideren.

Raadpleeg de relevante handleidingen van de betreffende QIAGEN®-kits voor specifieke vervolprocedures voor meer informatie over interfererende stoffen.

Kruisbesmetting

Voor het bepalen van de mate van kruisbesmetting zijn 10^5 kopieën van het HBV-virus toegevoegd aan 5 ml of 2 ml menselijk bloedplasma (positieve monsters) en geïsoleerd naast monsters zonder virus (negatieve monsters) in een schaakbordpatroon, en afgewisseld met extractieruns met alleen negatieve monsters (voor bepaling van de kruisbesmetting in en tussen extractieruns). In dit onderzoek werd geprobeerd een situatie na te bootsen waarin monsters met veel nucleïnezuurmoleculen via kruisbesmetting andere monsters in dezelfde extractieprocedure kunnen verontreinigen. Met één partij reagentia werd NZ-zuivering uitgevoerd. De mate van kruisbesmetting werd bepaald met behulp van de *artus*® HBV RG CE PCR Kit. Uit de resultaten bleek dat er binnen het gehele systeem geen kruisbesmetting was opgetreden.

Opmerkingen

Revisiegeschiedenis

Datum	Wijzigingen
R1 09-2019	Eerste uitgave
R2 08-2021	Opslagomstandigheden gereviseerd voor de stabiliteit van het eluaat getest op DNA: Opslag van -30 tot -15 °C en -90 tot -65 °C is mogelijk tot maximaal 12 maanden. Opslagomstandigheden gereviseerd voor de stabiliteit van het eluaat getest op RNA: Opslag van -30 tot -15 °C en -90 tot -65 °C is mogelijk tot maximaal 6 maanden. De fout in het prestatieblad aangepast: RNA-opslag is niet getest bij kamertemperatuur (15-25 °C). De onderzoeksgegevens omtrent precisie gecorrigeerd bij de SD- en CV-kolommen in tabel 1.

Zie de (gebruikers)handleiding van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. De handleiding en gebruiksaanwijzing van QIAGEN Kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen bij de technische diensten van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur worden aangevraagd.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, artus®, GeneRead®, GeneReader™ (QIAGEN Group); BD Vacutainer®, Becton Dickinson® (Becton Dickinson and Co.); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); PAXgene® (PreAnalytiX GmbH); Streck®, Cell-Free DNA BCT® (Streck Inc.); Qubit® (Thermo Fisher Scientific of haar dochterondernemingen).

HB-0466-D01-002 © 2021 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

