

QIAsymphony[®] DSP DNA Kit

Gebrauchsanweisung (Leistungsmerkmale)

Version 2

IVD

In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit QIAsymphony DSP DNA Mini Kit und QIAsymphony DSP DNA Midi Kit



REF

937236, 937255



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Deutschland

R1

Die Leistungsmerkmale sind elektronisch unter der Registerkarte „Resources“ (Ressourcen) auf der Produktseite unter www.qiagen.com verfügbar.

Allgemeine Einführung

Die QIASymphony DSP DNA Kits sind ausschließlich zur Verwendung in Kombination mit dem QIASymphony SP vorgesehen.

Die QIASymphony DSP DNA Mini Kits enthalten Reagenzien für die automatisierte Aufreinigung von Gesamt-DNA aus humanem Vollblut, Buffy-Coat, Gewebe- und formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) Gewebeproben sowie von viraler DNA aus humanem Vollblut. Die QIASymphony DSP DNA Midi Kits enthalten Reagenzien für die automatisierte Aufreinigung von Gesamt-DNA aus humanem Vollblut und Buffy-Coat. Allerdings wurden nicht für jede Art von Blutentnahmeröhrchen oder Gewebe Leistungsmerkmale ermittelt; diese sind vom Anwender zu validieren.

Die Magnetpartikel-Technologie ermöglicht die Aufreinigung qualitativ hochwertiger Nukleinsäuren, die frei von Proteinen, Nukleasen und anderen Kontaminationen oder Inhibitoren sind. Die aufgereinigten Nukleinsäuren können direkt in nachgelagerten Anwendungen wie z. B. Amplifikationsreaktionen (PCR) eingesetzt werden. Der QIASymphony SP führt alle Schritte des Aufreinigungsverfahrens durch. In einem Lauf können bis zu 96 Proben, jeweils in Chargen von bis zu 24 Stück, verarbeitet werden.

Im Folgenden sind ausgewählte Leistungsdaten für die verschiedenen Anwendungen aufgeführt.

Leistungsmerkmale

Hinweis: Die Leistungsmerkmale sind stark von verschiedenen Faktoren abhängig und mit der spezifischen nachgelagerten Anwendung verbunden. Sie wurden für die QIASymphony DSP DNA Mini und Midi Kits in Verbindung mit beispielhaften nachgelagerten Anwendungen ermittelt. Die Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Proben werden jedoch als Einstiegspunkt bei der Entwicklung zahlreicher nachgelagerter Anwendungen verwendet. Für jeden derartigen Arbeitsablauf müssen Leistungsparameter wie Kreuzkontaminationen oder Laufpräzision im Rahmen der Entwicklung der nachgelagerten Anwendung ermittelt werden. Aus diesem Grund liegt es in der Verantwortung des Benutzers, den gesamten Arbeitsablauf zu validieren, um geeignete Leistungsparameter zu etablieren.

Grundlegende Leistung und Kompatibilität mit verschiedenen nachgelagerten Anwendungen

DNA Blood und Buffy Coat

DNA-Ausbeute

Die grundlegende Leistung des QIASymphony DSP DNA Mini Kit wurde unter Verwendung von verschiedenen Blutentnahmeröhrchen und Antikoagulanzen sowie von frischem und gefrorenem humanem Vollblut bewertet. Vollblut von 3 gesunden Spendern (Leukozytenzahl [LEU] 4,0 bis 11,0 x 10⁶ Zellen/ml) wurde mit 3 verschiedenen Röhrchenarten entnommen: EDTA, 10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); Citrat, 2,7 ml Sarstedt® S-Monovette® 9NC Tube 13 x 75 mm (Citrat); Heparin, 7,5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (Li-Heparin). Das Blut wurde entweder frisch (aufbewahrt bei 2–8 °C) oder gefroren (aufbewahrt bei –20 °C) verwendet. Genomische DNA wurde unter Verwendung von 4 Replikaten je Spender und Röhrchentyp mit dem QIASymphony DSP DNA Mini Kit und dem Blood 200 DSP Protokoll mit einem Elutionsvolumen von 200 µl aus 200-µl-Proben aufgereinigt. DNA-Ausbeute und -Reinheit wurden mittels spektroskopischer Analyse bestimmt (Abbildung 1).

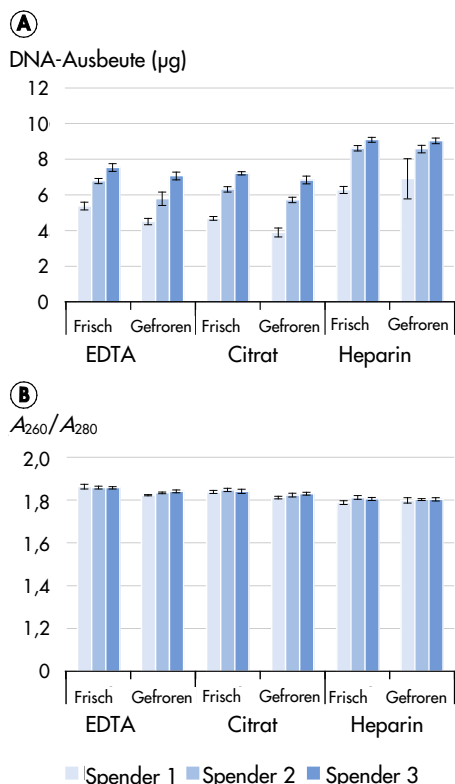


Abbildung 1. DNA-Ausbeute und -Reinheit bei Verwendung verschiedener Probenentnahmeröhrchen und Antikoagulanzen mit frischen und gefrorenen humanen Vollblutproben.
A DNA-Ausbeute; Balken zeigen die absolute DNA-Ausbeute mit Standardabweichung. **B** DNA-Reinheit; Balken zeigen die DNA-Reinheit mit Standardabweichung.

DNA-Integrität

Lange PCR-Produkte (5 kb) wurden mithilfe eines LongRange PCR-Assays amplifiziert (Abbildung 2).

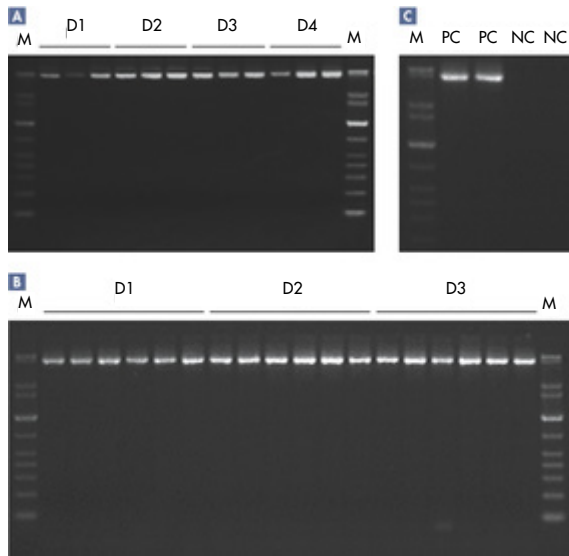


Abbildung 2. Mittels Long-range PCR getestete DNA-Integrität. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** Vollblut von 4 gesunden Spendern (Donor, D) wurde in BD K2E Röhrcchen entnommen. Genomische DNA für die Long-range PCR wurde unter Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini Kit und des Blood 200 DSP Protokolls mit einem Elutionsvolumen von 200 μ l in 3 Replikaten aus 200- μ l-Aliquoten aufgereinigt. D1, Spender 1; D2, Spender 2; D3, Spender 3, und D4, Spender 4. **B** Vollblut von 3 gesunden Spendern wurde in BD K2E Röhrcchen entnommen und Buffy-Coat wurde präpariert. Genomische DNA wurde unter Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini Kit und des Buffy Coat 200 DSP Protokolls mit einem Elutionsvolumen von 200 μ l in 6 Replikaten aus 200- μ l-Aliquoten aufgereinigt. D1, Spender 1; D2, Spender 2; und D3, Spender 3. **C** Kontrollen: PC, Positivkontrolle; und NC, Negativkontrolle.

Korrelation der DNA-Ausbeute zur LEU-Zahl

Die Leistung der QIASymphony DSP DNA Blood und Buffy Coat Anwendungen wurde unter Einsatz von Blut- und Buffy-Coat-Proben mit 6 verschiedenen LEU-Zahlen für jeden Probenotyp bewertet. Für Vollblut reichte die LEU-Zahl von 4×10^6 Zellen/ml bis $11,6 \times 10^6$ Zellen/ml und für Buffy-Coat von $2,2 \times 10^7$ Zellen/ml bis $5,6 \times 10^7$ Zellen/ml. Die DNA-Ausbeuten wurden durch spektroskopische Analyse bestimmt und gegen die LEU-Zahl aufgetragen (Abbildung 3).

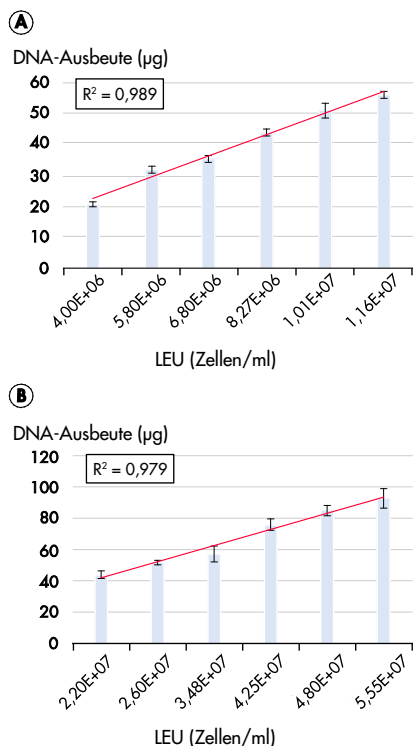


Abbildung 3. Korrelation der DNA-Ausbeute zur LEU-Zahl. **A** Genomische DNA wurde unter Verwendung des QIASymphony DSP DNA Midi Kit und des Blood 1000 DSP Protokolls mit einem Elutionsvolumen von 500 µl aus 1 ml humanem Vollblut aufgereinigt. Balken zeigen die absolute DNA-Ausbeute mit Standardabweichung. **B** Genomische DNA wurde unter Verwendung des QIASymphony DSP DNA Midi Kit und des Buffy Coat 400 DSP Protokolls mit einem Elutionsvolumen von 400 µl aus 400 µl Buffy-Coat aufgereinigt. Balken zeigen die absolute DNA-Ausbeute mit Standardabweichung.

Virus Blood

Trefferratenstudien wurden durch Verdünnung vorab quantifizierten CMV-Standardmaterials der WHO in CMV-negativem humanem Vollblut durchgeführt. Für Proben mit einer Viruslast von 90 IU CMV pro Milliliter wurde eine Nachweisrate von 100 % beobachtet (Tabelle 1).

Tabelle 1. Sensitivität der QIASymphony DSP Virus Blood Anwendung

CMV (IU/ml)	Replikate	Treffer	Treffer (%)
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

Humanes Vollblut von 1 gesunden, CMV-negativen Spender wurde in BD K2E Röhrchen entnommen und mit verschiedenen Titern des CMV-Standardmaterials der WHO versetzt. Die Virus-DNA wurde unter Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini Kit und des Virus Blood 200 DSP Protokolls mit einem Elutionsvolumen von 60 µl aufgereinigt. Die Eluate wurde mit einem Real-time PCR-Assay auf CMV analysiert.

Gewebe und FFPE-Gewebe

DNA-Ausbeute

Die Leistung der QIASymphony DSP DNA FFPE Tissue Anwendung wurde anhand von 6 Replikaten aus 1–4 FFPE-Schnitten je 10 µm aus frisch geschnittener menschlicher Milz bewertet. Die DNA-Extraktion wurde unter Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini Kit in Kombination mit dem Tissue Low Content DSP Protokoll durchgeführt. Entparaffinierung und Lyse wurden mit der Xylen/Ethanol-Vorbehandlungsmethode durchgeführt. Die DNA wurde in 50 µl Elutionspuffer eluiert und die Ausbeute an DNA wurde durch spektroskopische Analyse bestimmt (Abbildung 4).

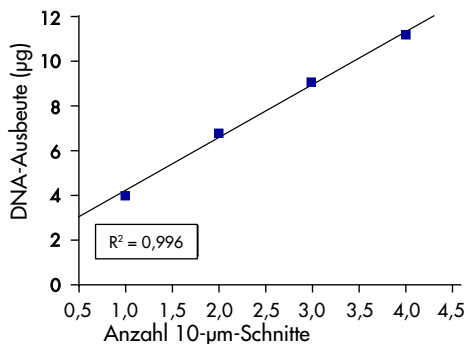


Abbildung 4. Korrelation der DNA-Ausbeute zur Anzahl der FFPE-Gewebeschnitte. Sechs Replikate je 1–4 FFPE-Gewebeschnitte von 10 µm aus der menschlichen Milz wurden durch Xylen/Ethanol-Vorbehandlung entparaffiniert. Die DNA-Extraktion wurde auf dem QIASymphony SP unter Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini Kit in Kombination mit dem Tissue Low Content DSP Protokoll und einem Elutionsvolumen von 50 µl durchgeführt.

Analyse des Mutationsstatus von Biomarkern mittels Real-time PCR

Die Analyse des Mutationsstatus von Biomarkern wurde unter Verwendung von DNA, die aus FFPE-Schnitten des menschlichen Dickdarms extrahiert wurde, und DNA; die aus menschlichen Lungengewebeproben extrahiert wurde, durchgeführt.

Für die DNA-Extraktion aus FFPE-Gewebeproben wurden 3 Schnitte je 10 µm des menschlichen Dickdarms für die Probenvorbereitung verwendet. Die DNA-Extraktion wurde unter Verwendung von Deparaffinization Solution zur Vorbehandlung und des Tissue Low Content DSP Protokolls in Kombination mit einem Elutionsvolumen von 100 µl durchgeführt. Die Mutationsanalyse des Biomarkers KRAS wurde unter Verwendung eines Real-time PCR-Assays zum Nachweis von KRAS in Übereinstimmung mit dem Assay-Handbuch durchgeführt. Die C_T -Werte des Kontrollassays lagen innerhalb des definierten Bereichs und die Mutationsanalyse zeigte eine Aminosäuresubstitution in Codon 12 an, demonstriert durch einen ΔC_T -Wert von 4,17, welcher unterhalb des definierten Cut-off-Werts von 8 für den Nachweis einer 12SER-Mutation liegt (Tabelle 2).

Tabelle 2. Ergebnisse der Mutationsanalyse für den KRAS-Biomarker in FFPE-Gewebe

Probe	Reaktion	Ziel-C _T	C _T der internen Kontrolle	ΔC _T *
Kontrolle ohne Template	Kontrolle	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	-
Standard	Kontrolle	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-Gewebe (menschlicher Dickdarm)	Kontrolle	24,94	31,98	-
	12ALA	n. n.	32,42	-
	12ASP	n. n.	32,73	-
	12ARG	n. n.	33,05	-
	12CYS	n. n.	32,74	-
	12SER	29,11	32,34	4,17
	12VAL	n. n.	32,81	-
	13ASP	n. n.	33,20	-

* $\Delta C_T = M C_T - C C_T$, wobei M für Mutation und C für Kontrolle steht; n. n., nicht nachgewiesen.

Für die DNA-Extraktion aus gefrorenen Gewebeproben wurden 25 mg menschlichen Lungengewebes für die Probenvorbereitung unter Verwendung des Tissue High Content DSP Protokolls und eines Elutionsvolumens von 200 µl verwendet. Die Mutationsanalyse des EGFR-Biomarkers wurde unter Verwendung eines Real-time PCR-Assays auf EGFR durchgeführt. Die Analyse der Kontrolle und der Mutationsnachweis wurden gemäß der Beschreibung im Assay-Handbuch durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine Deletion innerhalb des EGFR-Gens an, demonstriert durch einen ΔC_T -Wert von 2,47, welcher unterhalb des definierten Cut-off-Werts von 12 für den Nachweis einer Mutation liegt (Tabelle 3).

Tabelle 3. Ergebnisse der Mutationsanalyse für den EGFR-Biomarker in gefrorenem Gewebe

Probe	Reaktion	Ziel-C _T	C _T der internen Kontrolle	ΔC _T *
Kontrolle ohne Template	Kontrolle	0,00	31,71	-
	T790M	0,00	32,36	-
	Deletionen	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	-
Standard	Kontrolle	28,78	31,05	-
	T790M	30,08	31,13	1,30
	Deletionen	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
Gewebe (menschliche Lunge)	Kontrolle	25,76	31,23	-
	T790M	n. n.	31,99	-
	Deletionen	28,23	30,99	2,47
	L858R	n. n.	31,33	-
	L861Q	n. n.	31,98	-
	G719X	n. n.	32,06	-
	S768I	n. n.	31,88	-
	Ins	n. n.	31,62	-

* $\Delta C_T = M C_T - C C_T$, wobei M für Mutation und C für Kontrolle steht; n. n., nicht nachgewiesen.

Wiederholpräzision und Reproduzierbarkeit

DNA-Blut

Die DNA-Extraktion wurde unter Verwendung des Blood 200 DSP Protokolls mit einem Elutionsvolumen von 200 µl durchgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde durch einen einzelnen Bediener in 3 unabhängigen Läufen (je 96 Proben) an 3 verschiedenen Tagen bewertet, wobei jeder Lauf aus 4 Chargen je 24 Proben bestand (Tabelle 4 und Tabelle 5).

Die Reproduzierbarkeit wurde in 3 unabhängigen Läufen (je 96 Proben) an 3 verschiedenen Tagen durch 3 verschiedene Bediener auf unterschiedlichen QIASymphony SP Geräten bewertet, wobei jeder Lauf aus 4 Chargen je 24 Proben bestand (Tabelle 6 und Tabelle 7).

Tabelle 4. Ergebnisse der Wiederholbarkeitsbewertung

Lauf	Charge	n	Mittlere DNA-Ausbeute (µg)	SD	VK
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
Gesamt	–	288	4,96	–	–

n, Anzahl der Replikate; SD, Standardabweichung; VK, Variationskoeffizient.

Tabelle 5. Präzisionsdaten zur Bewertung der Wiederholbarkeit

	SD	VK
Charge zu Charge im gleichen Lauf	0,25	4,95
Wiederholpräzision insgesamt	0,26	5,18

SD, Standardabweichung, VK, Variationskoeffizient.

Tabelle 6. Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsbewertung

Lauf	Charge	n	Mittlere DNA-Ausbeute (µg)	SD	VK
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
Gesamt	–	288	5,38	–	–

n, Anzahl der Replikate; SD, Standardabweichung; VK, Variationskoeffizient.

Tabelle 7. Präzisionsdaten zur Bewertung der Reproduzierbarkeit

	SD	VK
Charge zu Charge im gleichen Lauf	0,25	4,73
Wiederholpräzision insgesamt	0,38	7,03

SD, Standardabweichung, VK, Variationskoeffizient.

Vergleichende Leistung

DNA Blood

Die Leistung wurde für das QIAAsymphony DSP DNA Blood System im Vergleich mit dem EZ1® DSP DNA Blood System und dem manuellen Vorbereitungsverfahren mit dem QIAamp® DNA Blood Mini Kit analysiert. DNA wurde aus verschiedenen Blutproben aufgereinigt und die DNA-Ausbeute wurde analysiert (Abbildung 5).

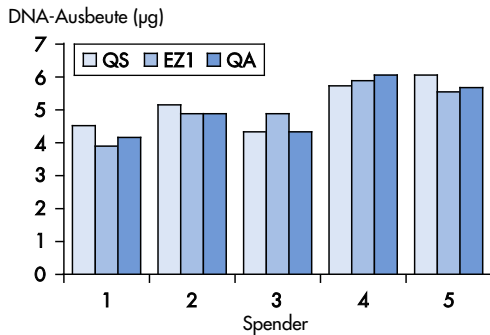


Abbildung 5. Vergleich der DNA-Ausbeute zwischen verschiedenen Systemen zur Aufreinigung von DNA aus Blut. Vollblut von 5 gesunden Spendern wurde in BD K2E Rörchen entnommen. Für alle Methoden wurden ein Probeneingabevolumen von 200 µl und ein Elutionsvolumen von 200 µl verwendet. QS, QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit und Blood 200 DSP Protokoll; EZ1, EZ1 Advanced XL unter Verwendung des EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA, QIAamp DNA Blood Mini Kit. Die Balken zeigen die absolute DNA-Ausbeute für die einzelnen Proben.

Gewebe und FFPE-Gewebe

Die Leistung des QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit wurde mit der Leistung des manuellen QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit und des QIAamp DSP DNA Mini Kit unter Verwendung von FFPE-Gewebeproben bzw. frischen und gefrorenen Gewebeproben als Probenmaterial verglichen. Manuelle und automatisierte Probenvorbereitungen sowie die Quantifizierung der DNA-Ausbeuten wurden gleichzeitig durchgeführt. Die DNA-Ausbeuten nach Extraktion aus frischen/gefrorenen und FFPE-Gewebeproben unter Verwendung des QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit, QIAamp DSP DNA Mini Kit (Gewebe) und des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE-Gewebe) sind in Abbildung 6 aufgeführt.

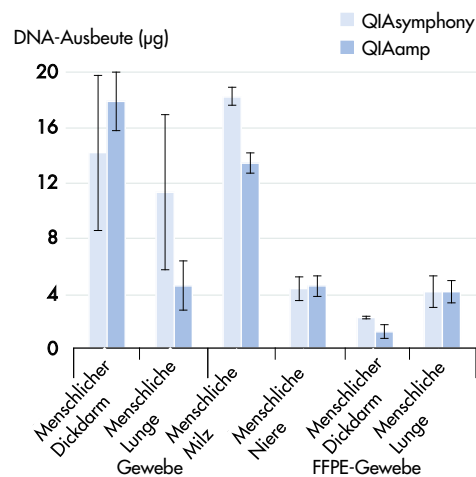


Abbildung 6. DNA-Extraktion aus Gewebe- und FFPE-Gewebeproben. Im Fall von frischem/gefrorenem Gewebe wurden Proben aus der menschlichen Lunge und dem menschlichen Dickdarm in 6 Stücke je 25 mg geschnitten. Drei Stücke jeder Gewebeart wurden für die Probenvorbereitung unter Verwendung des QIAAsymphony SP in Kombination mit dem DSP Protokoll für Gewebe mit hohem Gehalt verwendet. Die DNA-Extraktion aus Restproben wurde mithilfe des QIAamp DSP DNA Mini Kit durchgeführt. Die DNA wurde in 200 µl eluiert und die DNA-Ausbeute wurde durch spektroskopische Analyse bestimmt. Für die DNA-Extraktion aus FFPE-Gewebe wurden 12 Replikate aus 3 FFPE-Gewebeschnitten je 10 µm aus verschiedenen menschlichen Organen präpariert. Sechs Proben wurden für die Probenvorbereitung unter Verwendung des QIAAsymphony SP in Kombination mit der Behandlung mit Deparaffinization Solution und dem DSP Protokoll für Gewebe mit geringem Gehalt verwendet. Die DNA-Extraktion aus Restproben wurde mithilfe des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit durchgeführt. Die DNA wurde in 50 µl eluiert und die DNA-Ausbeute wurde durch spektroskopische Analyse bestimmt. Balken zeigen die absolute DNA-Ausbeute mit Standardabweichung.

Bereich von Probeneingabe-/Eluatausgabevolumen

DNA-Blut

Für die DNA Blood Anwendung wurden verschiedene Probeneingabe- und Eluatausgabevolumen unter Verwendung von Blutspenderproben mit LEU-Zahlen zwischen $5,0$ und $8,0 \times 10^6$ Zellen/ml verglichen.

Vollblut von 8 gesunden Spendern wurde in BD K2E Rörchchen entnommen. DNA wurde aus 6 Replikaten aufgereinigt, jeweils unter Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini/Midi Kit und des DNA Blood 200 DSP Protokolls mit $200 \mu\text{l}$ Elutionsvolumen, des DNA Blood 400 DSP Protokolls mit $400 \mu\text{l}$ Elutionsvolumen und des DNA Blood 1000 DSP Protokolls mit $500 \mu\text{l}$ Elutionsvolumen (Abbildung 7).

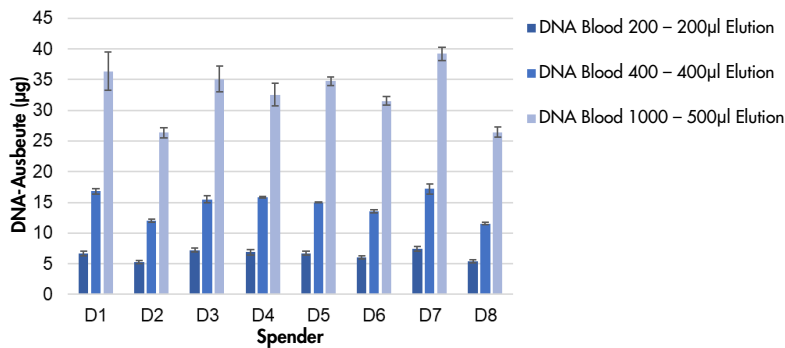


Abbildung 7. Vergleich verschiedener Probeneingabe- und Elutionsvolumen für die Blood DNA Aufreinigungssysteme. Vollblut von 8 gesunden Spendern wurde in BD K2E Rörchchen entnommen. Die DNA-Extraktion wurde unter Verwendung des DNA Blood 200 Protokolls mit $200 \mu\text{l}$ Elutionsvolumen, des DNA Blood 400 Protokolls mit $400 \mu\text{l}$ Elutionsvolumen und des DNA Blood 1000 Protokolls mit $500 \mu\text{l}$ Elutionsvolumen durchgeführt. Die DNA-Ausbeute wurde durch spektroskopische Analyse bestimmt. Die Balken zeigen die absolute DNA-Ausbeute (Mittelwert mit Standardabweichung) für jeden Spender.

Virus Blood

Vollblut wurde von 3 gesunden Spendern mit LEU-Zahlen zwischen $4,0$ und $11,0 \times 10^6$ Zellen/ml in BD K2E Rörchchen entnommen und mit CMV-Standardmaterial (Titer $3,7 \log$ Kopien/ml) versetzt. Die Virus-DNA wurde aus 7 Replikaten aufgereinigt, jeweils unter Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini Kit und des Virus Blood 200 DSP Protokolls mit 4 verschiedenen Elutionsvolumen (Abbildung 8).

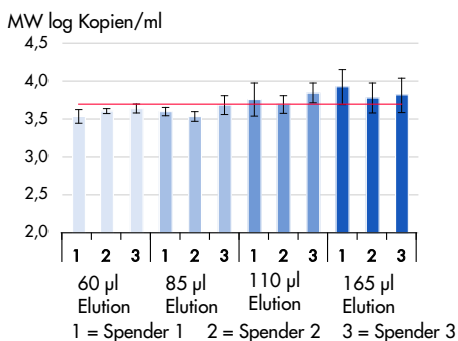


Abbildung 8. Vergleich der Virus-DNA-Quantifizierung für verschiedene Elutionsvolumen. Eluate jeder Spenderprobe und verschiedener Elutionsvolumen (60 , 85 , 110 und $165 \mu\text{l}$) wurden mit einem Real-time PCR-Assay auf CMV analysiert. Die rote Linie repräsentiert den Zieliter und die Balken zeigen den mittleren Logarithmus der Kopien pro Milliliter mit Standardabweichung.

Eluatstabilität

Hinweis: Die Eluatstabilität ist stark von verschiedenen Faktoren abhängig und mit der spezifischen nachgelagerten Anwendung verbunden. Sie wurde für das QIASymphony DSP DNA Mini und Midi Kit in Verbindung mit beispielhaften nachgelagerten Anwendungen ermittelt. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Gebrauchsanweisung der spezifischen, im Labor eingesetzten nachgelagerten Anwendung zurate zu ziehen und/oder den gesamten Arbeitsablauf zu validieren, um geeignete Lagerungsbedingungen zu ermitteln.

DNA Blood und Buffy Coat

Die Eluatstabilität für die DNA Blood Anwendung wurde unter Verwendung von Eluaten aus QS-Läufen, die mit dem DNA Blood 200 Protokoll mit 200 µl Elutionsvolumen und mit dem DNA Blood 1000 Protokoll mit 500 µl Elutionsvolumen durchgeführt wurden, getestet. Die Eluate wurden in 2-ml-Röhrchen von Sarstedt bei Raumtemperatur, 2–8 °C, –20 °C und –80 °C aufbewahrt. DNA-Ausbeute und -Reinheit wurden durch spektroskopische Analyse ermittelt. Die DNA-Integrität wurde mittels Gelelektrophorese und LongRange PCR-Assay analysiert (Abbildung 9).

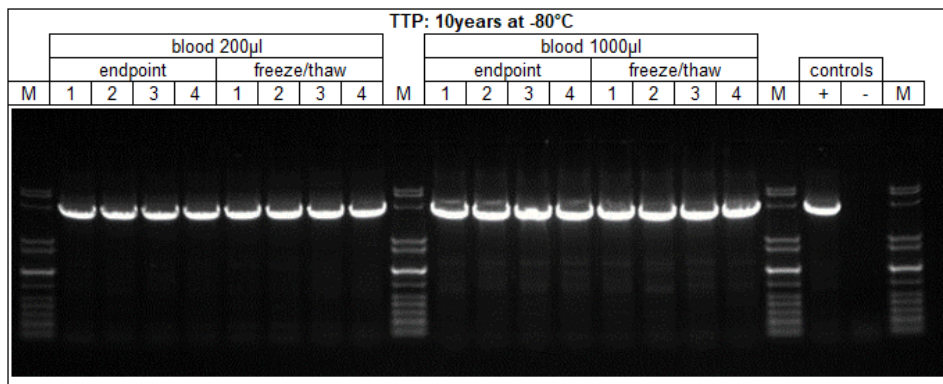


Abbildung 9. Eluatstabilität für DNA Blood. Die DNA wurde unter Verwendung der Protokolle DNA Blood 200 µl und 1000 µl aufgereinigt. Die Eluate wurden bei –80 °C in 2-ml-Röhrchen von Sarstedt aufbewahrt. Vier Replikate wurden analysiert. Die DNA-Integrität wurde mittels Long-range PCR getestet. Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse nach 10-jähriger Lagerung. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

Die Eluatstabilität für die Buffy Coat Anwendung wurde unter Verwendung von Eluaten aus QS-Läufen, die mit dem BC 400 µl Protokoll und einem Elutionsvolumen von 200 µl durchgeführt wurden, analysiert. Die Eluate wurden in 2-ml-Röhrchen von Sarstedt und Elutionsmikrozentrifugenröhrchenracks bei Raumtemperatur, 2–8 °C, –20 °C und –80 °C aufbewahrt. Darüber hinaus wurden die Eluate einem Einfrier-/Auftau-Test mit bis zu 3 Zyklen unterzogen (Abbildung 10). DNA-Ausbeute und -Reinheit wurden mittels spektroskopischer Analyse bestimmt. Die DNA-Integrität wurde mittels Gelelektrophorese und LongRange PCR-Assay (50-µl-Reaktion) analysiert.

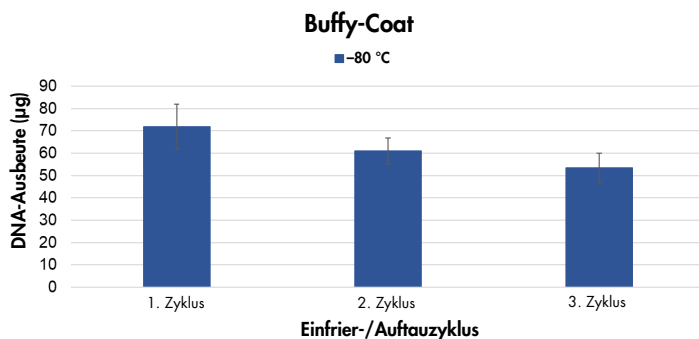


Abbildung 10. Einfrier-/Auftauzyklen der Eluate für Buffy-Coat. Die DNA wurde unter Verwendung des DNA BC 400 µl Protokolls aufgereinigt. Buffy-Coat wurde aus EDTA-Blut gewonnen. Die Eluate wurden in 2-ml-Röhrchen von Sarstedt aufbewahrt. Die Ausbeute an DNA wurde anhand des jeweils gleichen Eluats unter Durchführung von 3 Einfrier-/Auftauzyklen zu den Testzeitpunkten bestimmt. Die DNA-Ausbeute wurde durch spektroskopische Analyse bestimmt. Die Balken zeigen die absolute DNA-Ausbeute (Mittelwert mit Standardabweichung).

Virus Blood

Die Eluatstabilität für die Virus Blood Anwendung wurde unter Verwendung von Eluaten aus QS-Läufen, die mit dem Virus Blood 200 Protokoll mit 60 µl Elutionsvolumen durchgeführt wurden, getestet. Als Probenmaterial wurde mit handelsüblichem CMV-Standard (Titer 2,7 log Kopien/ml) versetztes K₂-EDTA-Blut verwendet. Die Eluate wurden in 2-ml-Röhrchen von Sarstedt bei 2–8 °C, –20 °C und –80 °C aufbewahrt. Die Eluate wurden unter Verwendung eines Real-time Assays auf CMV analysiert (Abbildung 11). Nachstehend sind die Ergebnisse für verschiedene Testzeitpunkte aufgeführt.

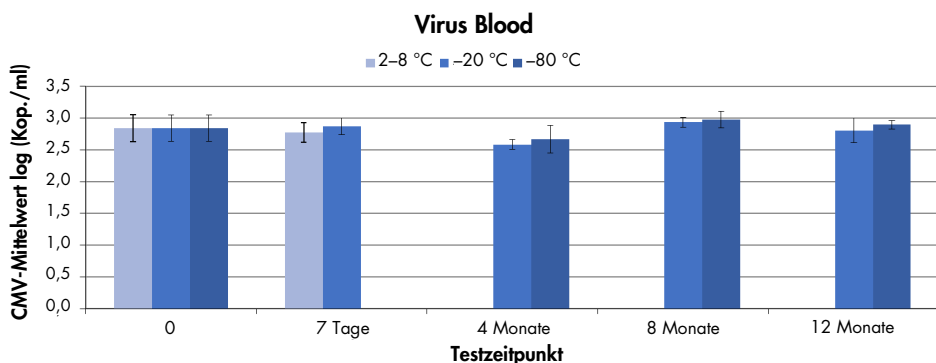


Abbildung 11. Eluatstabilität für die Virus Blood Anwendung. Mit handelsüblichem CMV-Standard versetzte EDTA-Blutproben wurden mit dem Virus Blood 200 Protokoll aufgereinigt. Die Eluate wurden bei verschiedenen Temperaturen in Elutionsmikroröhrchenracks und 2-ml-Röhrchen von Sarstedt aufbewahrt. Pro Testzeitpunkt wurden 4 Replikate analysiert. Die Balken zeigen den CMV-Titer (mittlerer log-Wert mit Standardabweichung).

Gewebe

Die Eluatstabilität für die Gewebeanwendung wurde mit dem Tissue HC 200 µl Protokoll und einem Elutionsvolumen von 200 µl getestet. Als Probenmaterial wurde frische Rinderleber verwendet. Die Eluate wurden in 2-ml-Röhrchen von Sarstedt und Elutionsmikrozentrifugenröhrchenracks bei Raumtemperatur, 2–8 °C, –20 °C und –80 °C aufbewahrt. DNA-Ausbeute und -Reinheit wurden durch spektroskopische Analyse ermittelt (Abbildung 12). Die DNA-Integrität wurde mittels Gelelektrophorese analysiert.

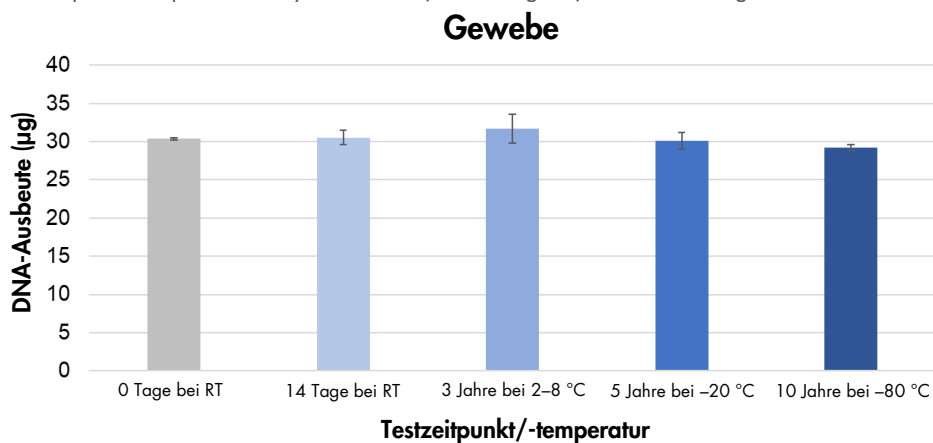
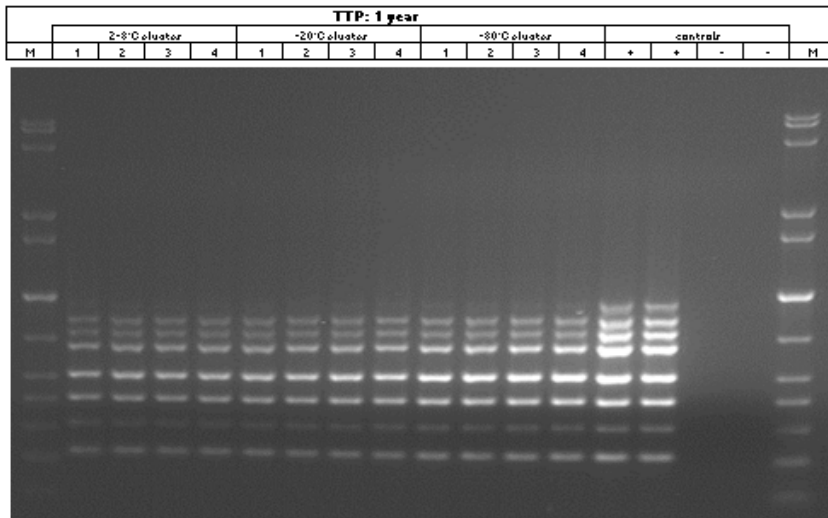


Abbildung 12. Eluatstabilität für Gewebe. Die DNA wurde unter Verwendung des DNA Tissue HC Protokolls mit einem Elutionsvolumen von 200 µl aufgereinigt. Als Probenmaterial wurde frische Rinderleber verwendet. Die Eluate wurden bei verschiedenen Temperaturen in Elutionsmikroröhrchenracks und 2-ml-Röhrchen von Sarstedt aufbewahrt. Pro Testzeitpunkt wurden 4 Replikate analysiert. Die DNA-Ausbeute wurde durch spektroskopische Analyse bestimmt. Die Balken zeigen die absolute DNA-Ausbeute (Mittelwert mit Standardabweichung).

FFPE-Gewebe

Die Eluatstabilität für die FFPE Tissue Anwendung wurde mit dem Tissue LC 200 µl Protokoll und einem Elutionsvolumen von 100 µl getestet. Als Probenmaterial wurde handelsübliches humanes FFPE-Gewebe verwendet. Die Eluate wurden in 2-ml-Röhrchen von Sarstedt und Elutionsmikrozentrifugenröhrchenracks bei Raumtemperatur, 2–8 °C, –20 °C und –80 °C aufbewahrt. Die Eluate wurden mit einem hauseigenen humanen 8-plex PCR-Assay analysiert (Abbildung 13). Nachstehend sind die Ergebnisse für zwei Testzeitpunkte aufgeführt.

A:



B:

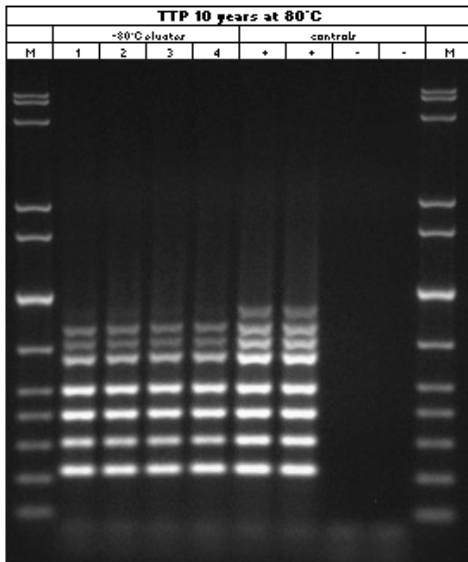


Abbildung 13. Eluatstabilität für FFPE-Gewebe. Die DNA wurde unter Verwendung des DNA Tissue LC Protokolls aufgereinigt. Als Probenmaterial wurde handelsübliches FFPE-Gewebe verwendet. Die Eluate wurden bei verschiedenen Temperaturen in Elutionsmikrozentrifugenröhrchenracks und 2-ml-Röhrchen von Sarstedt aufbewahrt. Pro Testzeitpunkt wurden 4 Replikate analysiert. Die Eluate wurden mit einem hauseigenen humanen 8-plex PCR-Assay analysiert.

Störsubstanzen

Der Einfluss inhibitorischer Substanzen, die in Vollblut enthalten sein können, auf die Leistung der DNA Blood Anwendung, der Virus Blood Anwendung und der Tissue Anwendung wurde durch Zugabe der folgenden Substanzen getestet:

Tabelle 8. Für die verschiedenen Anwendungen getestete potenzielle Störsubstanzen

Störsubstanzen	Konzentration	Blood	Virus Blood	Gewebe
Bilirubin	200 mg/l	√	√	√
Hämoglobin	200 g/l	√	√	
Triglyceride	30 g/l	√	√	√
Protein	120 g/l	√	√	√

Hinweis: „√“ gibt an, welche Probenmaterialien auf die entsprechende potenzielle Störsubstanzen getestet wurden.

Für Hämoglobin (200 g/l) und Protein (120 g/l) wurden die in der Blutprobe vorliegenden Konzentrationen ermittelt und zusätzliches Hämoglobin oder Protein wurde zugegeben, um die angegebene Konzentration von 200 bzw. 120 g/l zu erhalten. Für Bilirubin (200 mg/l) und Triglyceride (30 g/l) wurde die Gesamtmenge jeder Substanz den Proben zugegeben, um die angegebenen Konzentrationen zu erhalten.

Für Gewebe wurde die Gesamtmenge jeder Substanz direkt den Lysaten zugegeben; eine Bestimmung der Bilirubin-, Triglycerid- oder Proteinkonzentration der eingesetzten Gewebeprobe wurde nicht durchgeführt.

Alle potenziellen Störsubstanzen (z. B. Medikamente) und die entsprechenden Konzentrationen sind sehr spezifisch für die nachgelagerte Anwendung. Im Rahmen der Verifizierung einer solchen nachgelagerten Anwendung unter Verwendung der QIASymphony DSP DNA Mini und Midi Kits müssen daher eventuelle zurückliegende medizinische Behandlungen eines Patienten untersucht werden.

Hinweis: Die Tests wurden anhand beispielhafter nachgelagerter Anwendungen durchgeführt, um die Qualität der extrahierten Nukleinsäuren zu beurteilen. Verschiedene nachgelagerte Anwendungen können jedoch unterschiedliche Anforderungen an die Reinheit stellen (d. h. Abwesenheit oder Konzentration potenzieller Störsubstanzen). Aus diesem Grund müssen auch die Identifizierung und das Testen relevanter Substanzen und der entsprechenden Konzentrationen im Rahmen der Entwicklung nachgelagerter Anwendungen für jeden Workflow mit dem QIASymphony DSP DNA Mini und Midi Kit etabliert werden.

Hinweis: Es ist zu beachten, dass im Rahmen der Entwicklung des QIASymphony DSP DNA Midi Kit keine Hinweise darauf beobachtet wurden, dass Heparin sich negativ auf die Leistung auswirkt. Gemäß ISO 20186-2:2019(E) kann Heparin aus Blutentnahmeröhrchen die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren beeinträchtigen und eine mögliche Verschleppung in die Eluate könnte bei einigen nachgelagerten Anwendungen zu Inhibitionen führen. Aus diesem Grund liegt es in der Verantwortung des Anwenders, zu validieren, ob Heparin negative Auswirkungen auf den jeweiligen Workflow hat.

DNA Blood und Buffy Coat

Für die DNA Blood Anwendungen wurden Tests unter Verwendung des DSP DNA 1000 Protokolls durchgeführt, welches das größte Probeneingabevolumen abdeckt und mit Elutionsvolumen von 200 und 500 µl arbeitet.

Die Werte wurden mittels spektroskopischer Analyse auf DNA-Ausbeute und -Reinheit analysiert. Die PCR-Kompatibilität wurde unter Verwendung einer Real-time PCR sowie eines Endpunkt-PCR-Assays getestet.

Keine der in Tabelle 9 aufgeführten Substanzen erwies sich als Störsubstanz; allerdings kann es bei Blutproben mit hohen Konzentrationen an Triglyceriden (> 30 g/l) zu einer reduzierten gDNA-Ausbeute kommen.

Virus Blood

Für die Virus Blood Anwendung wurden Tests unter Verwendung des DSP Virus Blood 200 Protokolls mit einem Elutionsvolumen von 60 µl durchgeführt. CMV-negative Blutproben wurden mit 500 Kopien/ml (niedrige Konzentration) und 1×10^4 Kopien/ml (hohe Konzentration, Abbildung 14) eines handelsüblichen CMV-Standards versetzt.

Die Eluate wurde mit einem Real-time PCR-Assay auf CMV analysiert.

Keine der in Tabelle 9 aufgeführten Substanzen erwies sich als Störsubstanz; allerdings kann es bei Blutproben mit hohen Konzentrationen an Triglyceriden (> 30 g/l) zu einer reduzierten Aufreinigung von Virus-DNA kommen.

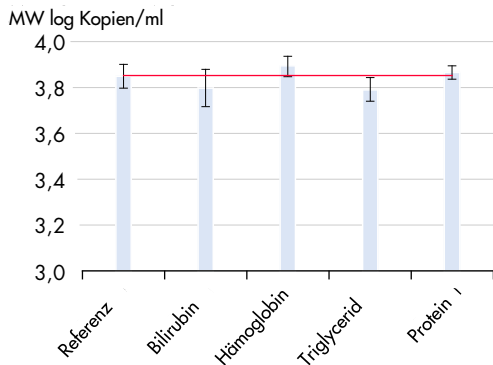


Abbildung 14. Test auf Störsubstanzen. Vollblut von 1 gesunden Spender wurde in BD K2E Röhrchen entnommen und mit CMV-Standardmaterial (Titer 4,0 log Kopien/ml) versetzt. Fünf Proben wurden durch Zugabe potenzieller Inhibitoren getestet. Virus-DNA wurde unter Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini Kit und des Virus Blood 200 DSP Protokolls mit einem Elutionsvolumen von 165 µl aus 4 Replikaten jeder Probe aufgereinigt. Die Eluate wurde mit einem Real-time PCR-Assay auf CMV analysiert. Die rote Linie repräsentiert den ermittelten Titer für Referenzproben, die nicht mit Störsubstanzen versetzt wurden, und die Balken zeigen den mittleren Logarithmus der Kopien pro Milliliter mit Standardabweichung.

Gewebe

Für DNA-Gewebe (frisch und gefroren) wurden Tests unter Verwendung des DSP DNA HC Protokolls mit einem Elutionsvolumen von 200 µl durchgeführt.

Die Werte wurden mittels spektroskopischer Analyse auf DNA-Ausbeute und -Reinheit analysiert. Die PCR-Kompatibilität wurde unter Verwendung eines Real-time PCR-Assays getestet.

Bei keiner der in Tabelle 9 aufgeführten Substanzen wurden negative Auswirkungen auf die Probenvorbereitung beobachtet.

FFPE-Gewebe

Für FFPE-Gewebe wurden Tests unter Verwendung des DSP DNA LC Protokolls mit einem Elutionsvolumen von 50 µl durchgeführt.

Die Substanzen (siehe Tabelle 9) wurden direkt dem Lysat zugegeben.

Tabelle 9. Für die verschiedenen Anwendungen getestete potenzielle Störsubstanzen

Störsubstanzen	Konzentration im Lysat
Xylen	Bis zu 11 %
Ethanol	Bis zu 11 %
Deparaffinization Solution	Bis zu 11 %
Paraffin	0,1-µm-Schnitt

Die Werte wurden mittels spektroskopischer Analyse auf DNA-Ausbeute und -Reinheit analysiert. Die PCR-Kompatibilität wurde unter Verwendung einer Real-time PCR sowie eines hauseigenen humanen 8-plex PCR-Assay getestet.

Bei keiner der in Tabelle 9 aufgeführten Substanzen wurden negative Auswirkungen auf die Probenvorbereitung beobachtet.

Kreuzkontaminationen





DNA-Blut

Das Risiko von Kreuzkontaminationen mit der QIASymphony DNA Blood Anwendung wurde analysiert, indem vier Läufe je 96 Proben auf dem QIASymphony SP Gerät mit schachbrettartig alternierenden Chargen (abwechselnd positive und negative Proben), unterbrochen von vollständig negativen Chargen, durchgeführt wurden. Als Modellsystem wurde Blut von Männern (mit einer LEU-Zahl $\geq 1,0 \times 10^7$ Zellen/ml) und Blut von Frauen (mit einer LEU-Zahl zwischen $4,0 \times 10^6$ und $9,0 \times 10^6$ Zellen/ml) verwendet. Die Probenvorbereitung wurde unter Verwendung des Blood 1000 µl Protokolls, welches das höchste Probenvolumen abdeckt, durchgeführt. Eine potenzielle Kontamination der negativen Proben von Frauen im Rahmen der Extraktionsläufe wurde durch anschließende Analyse der Eluate mittels Real-time PCR auf das Y-Chromosom beurteilt.

Es wurde keine Kreuzkontamination durch Verschleppung von Probe zu Probe, Charge zu Charge oder Lauf zu Lauf erkannt.

Symbole

Die folgenden Symbole werden in diesem Dokument verwendet. Eine vollständige Liste der in der Gebrauchsanweisung oder auf Verpackung und Etikettierung verwendeten Symbole finden Sie im Handbuch.

Symbol	Bedeutung des Symbols
	Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der europäischen Verordnung 2017/746 über In-vitro-Diagnostika.
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
Rn	R steht für Revision der Gebrauchsanweisung, n ist die Revisionsnummer
	Hersteller

Bearbeitungsverlauf

Revision	Beschreibung
R1, Juni 2022	<p>Version 2, Revision 1</p> <ul style="list-style-type: none">• Aktualisierung auf Version 2 für Konformität mit der IVDR• Abschnitte für Störsubstanzen, Kreuzkontaminationen, Eluatstabilität und Kompatibilität mit nachgelagerten Anwendungen hinzugefügt

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit-Handbuch oder Benutzerhandbuch. QIAGEN Kit-Handbücher und Benutzerhandbücher sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAsymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

