

QIAsymphony® DSP Circulating DNA Kit Gebrauchsanweisung (Leistungsmerkmale)

IVD

Zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik

Zur Verwendung mit

	Σ	REF	Version
QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	192	937556	V2
QIAsymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192)	192	937566	V1
QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit (96)	96	937555	V1



R2

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

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

Allgemeine Einführung

Das QIASymphony DSP Circulating DNA System ist ein gebrauchsfertiges In-vitro-Diagnostikum zur qualitativen Aufreinigung von zirkulierender zellfreier DNA (ccfDNA) aus Humanplasma und -urin.

Der QIASymphony DSP Circulating DNA Kit ist ausschließlich für den Gebrauch mit dem QIASymphony SP Gerät vorgesehen.

Das QIASymphony DSP Circulating DNA Kit enthält Reagenzien für die vollautomatisierte und gleichzeitige Aufreinigung von ccfDNA einer breiten Spanne an Humanplasma-Typen (mit ccfDNA-Profilstabilisatoren, z. B. PAXgene® Blood ccfDNA Tube von PreAnalytiX, Cell-Free DNA BCT® von Streck® sowie ohne ccfDNA-Profilstabilisatoren, z. B. EDTA-Röhrchen) und Humanurin (mit und ohne ccfDNA-Profilstabilisatoren). Nicht für jedes Blutentnahmeröhrchen wurde jedoch eine Leistungscharakteristik erstellt, diese ist vielmehr vom Anwender zu validieren.

Die aufgereinigte ccfDNA ist mit einer großen Bandbreite an nachgelagerten Anwendungen kompatibel wie z. B. PCR-Reaktionen, Fluoreszenz-basierten Quantifizierungsassays oder NGS.

Der QIASymphony SP führt alle Schritte des Aufreinigungsprotokolls aus. Bis zu 96 Proben, jeweils in Chargen von bis zu 24 Stück, können in einem Lauf verarbeitet werden. Bei Urinproben kann eine manuelle Vorbehandlung erforderlich sein.

Hinweis: Die Leistungsmerkmale hängen stark von verschiedenen Faktoren ab und stehen in Verbindung mit der jeweiligen nachgelagerten Anwendung. Dies wurde für das QS DSP Circulating DNA Kit in Verbindung mit exemplarischen nachgelagerten Anwendungen nachgewiesen. Methoden für die Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Proben werden jedoch als Front-End für mehrere nachgelagerte Anwendungen verwendet. Die Leistungsparameter, beispielsweise Kreuzkontamination und Laufpräzision, müssen bei der Entwicklung einer nachgelagerten Anwendung für jeden Arbeitsablauf bestimmt werden. Es liegt daher in der Verantwortung des Anwenders, den gesamten Arbeitsablauf zu validieren, um geeignete Leistungsparameter festzulegen.

Grundlegende Leistungscharakteristik

Die grundlegende Leistung des QIASymphony DSP Circulating DNA Kit wurde anhand von ccfDNA von 48 Einzelspendern evaluiert, die aus 4 ml Streck-Plasma und 4 ml stabilisiertem Urin extrahiert wurde. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die RNA-Codiersequenz des Ribosoms 18S bestimmt.

Die in Abbildung 1 (4 ml Plasma) und Abbildung 2 (4 ml Urin) erkennbaren Unterschiede in der Ausbeute (log₁₀ Kopien/ml) spiegeln die starke Spenderabhängigkeit der ccfDNA-Konzentration bei gleichem Volumen des jeweiligen Probenmaterials wider.

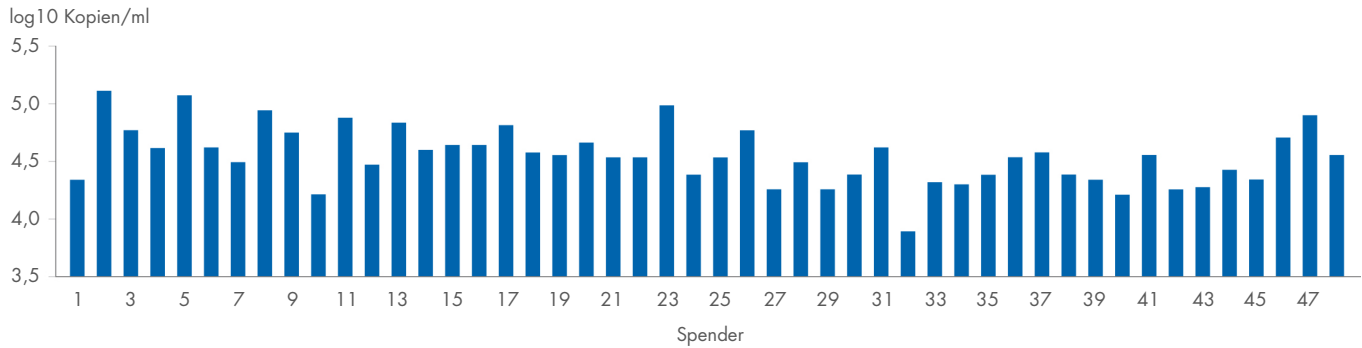


Abbildung 1. Die cfDNA-Ausbeute aus Plasma von 48 Einzelspendern. Die Blutspende von 48 Einzelspendern erfolgte in Cell-Free DNA BCT von Streck. CcfDNA wurde aus 4 ml Plasma unter Verwendung des QIASymphony DSP Circulating DNA Kit extrahiert. Die cfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die die 18S-RNA codierende Sequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je Milliliter Plasma-Eingabevolumen berechnet.

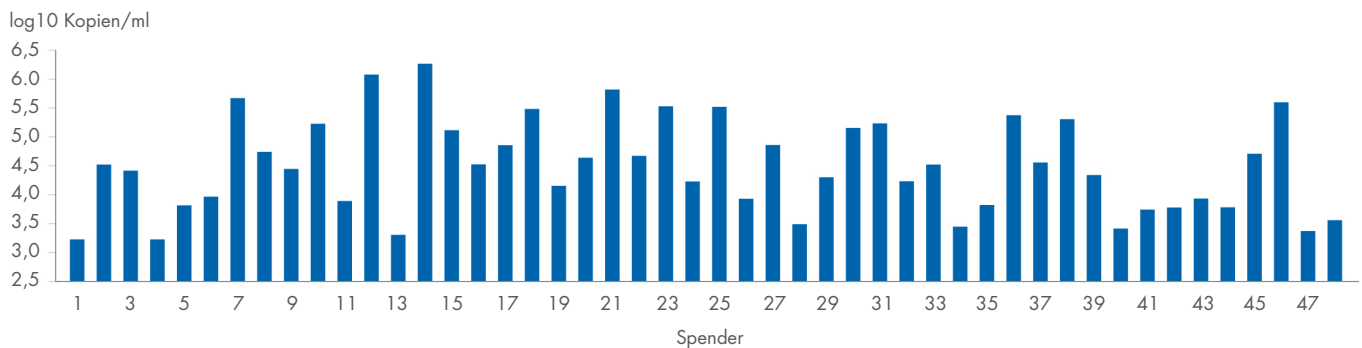
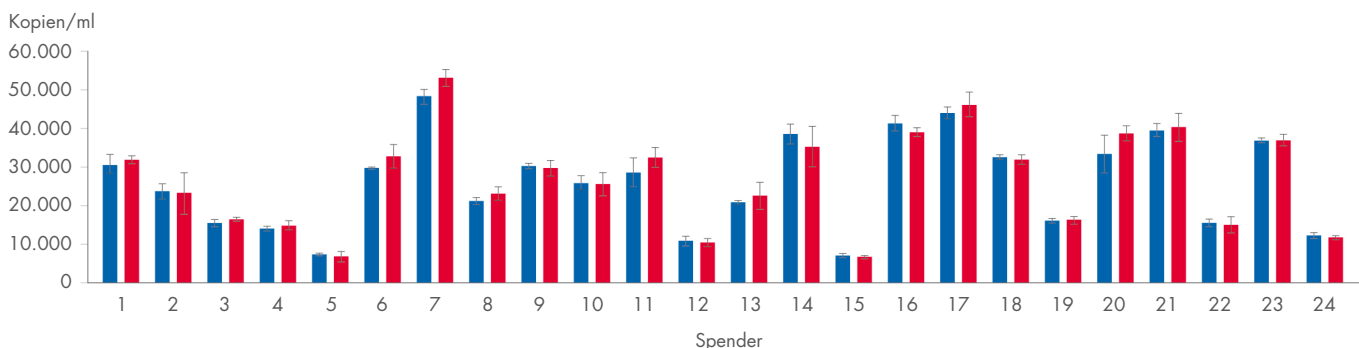


Abbildung 2. Die cfDNA-Ausbeute aus Urin von 48 Einzelspendern. Von 48 Einzelpersonen gespendeter Urin wurde mithilfe von Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck) stabilisiert. CcfDNA wurde aus 4 ml Urin mithilfe des QIASymphony DSP Circulating DNA Kit extrahiert. Die cfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die die 18S-RNA codierende Sequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je Milliliter Urin-Eingabevolumen berechnet.

Darüber hinaus wurde die grundlegende Leistung des QIASymphony DSP Circulating DNA Kit im Vergleich mit einer manuellen cfDNA-Extraktionsmethode, dem QIAamp DSP Circulating NA Kit, Kat.-Nr. 61504, bewertet. Zu diesem Zweck wurde Plasma aus PAXgene® Blood ccfDNA-Röhrchen (CE-IVD) von 24 Einzelspendern zur cfDNA-Extraktion aus 4 ml Volumen hergestellt und die cfDNA für beide cfDNA-Extraktionskits in 75 µl eluiert. Die cfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die RNA-Codiersequenz des Ribosoms 18S bestimmt. Die in Abbildung 3 erkennbaren Unterschiede in der Ausbeute (Kopien/ml) spiegeln die starke Spenderabhängigkeit der cfDNA-Konzentrationen wider, die typischerweise bei Plasma auftritt.



● QIASymphony DSP Circulating DNA Kit ● QIAamp DSP Circulating NA Kit

Abbildung 3. Äquivalente cfDNA-Extraktionsleistung für das QIASymphony DSP Circulating DNA Kit im Vergleich mit dem QIAamp DSP Circulating NA Kit. Von 24 Einzelspendern entnommenes Plasma wurde mithilfe eines PAXgene Blood ccfDNA-Röhrchens stabilisiert. CcfDNA wurde aus 4 ml Plasma unter Verwendung des QIASymphony DSP Circulating DNA Kit und des QIAamp DSP Circulating NA Kit extrahiert. Die cfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die die 18S-RNA codierende Sequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je Milliliter Plasma-Eingabevolumen berechnet.

Die Leistung des automatisierten und des manuellen ccfDNA-Extraktionskits ist äquivalent und wird in berechneten Kopien/ml gemessen. Der Quotient der geometrischen Mittelwerte für das QIASymphony DSP Circulating DNA Kit und das QIAamp DSP Circulating NA Kit ist in Tabelle 1 dargestellt (das Referenzkit ist das QIASymphony DSP Circulating DNA Kit).

Tabelle 1. Quotient der geometrischen Mittelwerte des QIAamp DSP Circulating NA Kit / QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (N= 213)

Parameter	Wert
Geschätzter Quotient des als Kopien/ml berechneten geometrischen Mittelwerts	1,074
Untere 95%-Konfidenzgrenze	1,048
Obere 95%-Konfidenzgrenze	1,100

Laufpräzision

Es wurden Variationskoeffizienten (VK) für die Extraktion von humaner ccfDNA aus EDTA-Plasma bestimmt. Für die Präzisionsanalyse wurde die ccfDNA mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assays für die RNA-Codiersequenz des Ribosoms 18S quantitativ bestimmt. Es wurden insgesamt je 10 QIASymphony Läufe in 4 Chargen (8 Replikate je Charge) durchgeführt. Die Präzisionsdaten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2. Auswertung der Präzisionsuntersuchungen

Präzision	VK (%)
Innerhalb der Charge	11,67
Wiederholpräzision	13,14
Laborpräzision	13,14
Gesamtpräzision	14,12

Leistungsäquivalenz des 2-ml- und des 4-ml-Protokolls

Die Leistungsäquivalenz der Protokolle für 2-ml- und 4-ml-Probenaufgabevolumen wurde für das QIASymphony DSP Circulating DNA Kit anhand von endogener ccfDNA evaluiert, die aus einem EDTA-Humanplasmapool extrahiert wurde. Es wurden insgesamt je 8 unabhängige Läufe mit dem QIASymphony in 4 Chargen (8 Replikate je Charge) durchgeführt. Der lineare Bereich des Verfahrens mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die die 18S-RNA codierende Sequenz bestimmt (Abbildung 4). Das Verhältnis der Differenz zwischen dem 2-ml- und dem 4-ml-Protokoll ist in Tabelle 3 gezeigt. (Das Referenzprotokoll ist 4-ml-Probeneingabe).

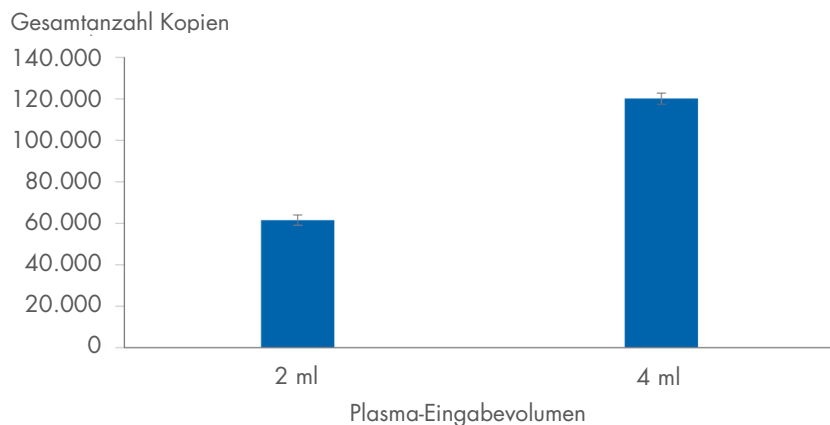


Abbildung 4. Leistungsäquivalenz bei Anwendung der Protokolle mit 2 und 4 ml Probenaufgabevolumen. Der lineare Bereich des ccfDNA-Protokolls wurde anhand des 2-ml- und des 4-ml-Protokolls bestimmt. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die die 18S-RNA codierende Sequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Kopien-Gesamtanzahl je Protokoll berechnet.

Tabelle 3. Differenz zwischen dem 2-ml- und dem 4-ml-Protokoll (N= 256)

Parameter	Wert
Geschätzter Quotient des als Kopien/ml berechneten geometrischen Mittelwerts	1,01
Untere 95%-Konfidenzgrenze	0,92
Obere 95%-Konfidenzgrenze	1.11
Gesamtpräzision	14,12

Die Leistung der Protokolle für 2- und 4-ml-Probeneingabe ist äquivalent und wird in berechneten Kopien/ml gemessen.

Lineare ccfDNA-Extraktionseffizienz aus 1 ml bis 10 ml Probenvolumen

Die Leistungsäquivalenz der Protokolle bei 1 ml bis 10 ml Probenaufgabevolumen wurde für den QIASymphony DSP Circulating DNA Kit anhand von endogener ccfDNA evaluiert, die aus einem Humanplasma- und einem Urinpool extrahiert wurde. Das Plasma wurde mit Streck Cell-Free DNA BCT® hergestellt und der Urin wurde mit dem Streck® Urine Preservative stabilisiert. Das stabilisierte Plasma und der stabilisierte Urin von mindestens 10 Spendern wurde jeweils gepoolt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. CcfDNA wurde aus 1, 2, 4, 6, 8 und 10 ml Probenvolumen unter Verwendung des QIASymphony DSP Circulating DNA Kit in Kombination mit den circDNA-Protokollen für 1 ml bis 10 ml Probenvolumen extrahiert. Für jedes Eingabevolumen wurden 12 Replikate extrahiert. Der lineare Bereich des Verfahrens mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die die 18S-RNA codierende Sequenz bestimmt (Abbildung 5).

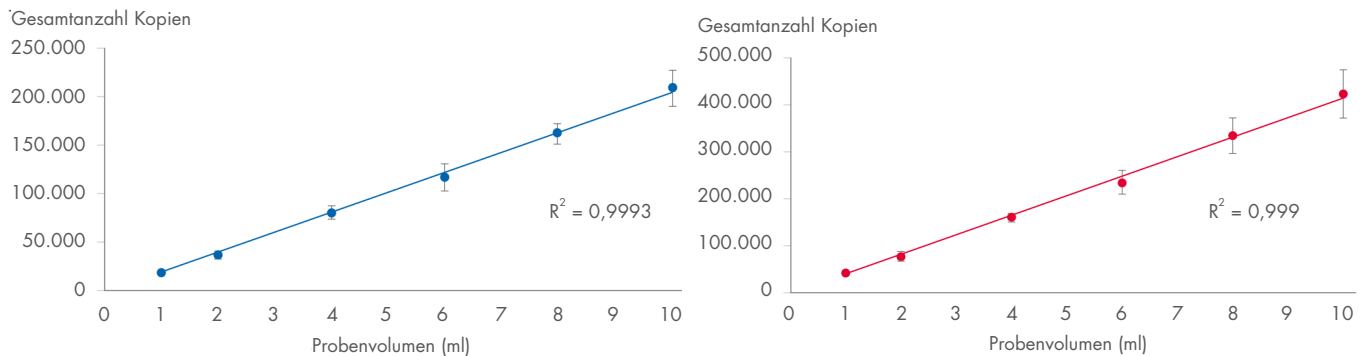


Abbildung 5. Lineare ccfDNA-Extraktionseffizienz aus 1 ml bis 10 ml Probenvolumen. Der lineare Bereich des ccfDNA-Protokolls wurde anhand des 1-, 2-, 4-, 6-, 8- und 10-ml-Protokolls bestimmt. CcfDNA wurde aus stabilisiertem Plasma (linke Abbildung, blaue Punkte) und stabilisiertem Urin (rechte Abbildung, rote Punkte) extrahiert. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die die 18S-RNA codierende Sequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Kopien-Gesamtanzahl je Protokoll berechnet.

Größenverteilung

Zur Evaluierung der Größenverteilung der Probenausgabe wurde ccfDNA mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit aus einer Probenaufgabe von 4 ml extrahiert und in 75 µl eluiert, anschließend wurde 1 µl des Eluats einer Größenanalyse auf dem Agilent® 2100 Bioanalytiker mit dem Agilent High Sensitivity DNA Chip unterzogen. Insgesamt wurden fünf unabhängige Replikate untersucht. Ein repräsentatives DNA-Profil für Plasma ist in Abbildung 6A und eines für Urin in Abbildung 7 dargestellt.

Das Elektropherogramm für Plasma in Abbildung 6A zeigt den häufig beobachteten Peak bei ca. 165 bp, der von 145 bp bis 196 bp reicht, was in den Längenbereich der histongebundenen DNA im Nukleosom fällt. Im Elektropherogramm für Urin in Abbildung 7 ist der vorherrschende Peak bei ca. 160 bp breiter und reicht von ca. 145 bp bis 250 bp. Zudem ist bei Urin ein zweiter Peak im Bereich von ca. 20 bp bis 100 bp (auf Höhe des unteren Marker-Peaks) vorhanden, was darauf hindeutet, dass eine stärker fragmentierte ccfDNA-Fraktion vorliegt. Außerdem zeigt Abbildung 7 eine hohe Zahl von langen DNA-Fragmenten ab ca. 2 kb. Solche genomischen DNA-Fragmente sind bei Urinproben häufig in großer Menge zu beobachten, höchstwahrscheinlich, weil im Urin vorhandene Zellen genomische DNA freisetzen.

Bei der Extraktion von cfDNA aus großen Probenvolumina werden neben dem Peak bei ca. 165 bp für die Histon-gebundene DNA (Mononukleosom) zusätzlich Peaks für die Multinukleosomen bei ca. 350 bp und > 500 bp gefunden (Abbildung 6B). Zu diesem Zweck wurde ccfDNA aus 1 bis 10 ml Plasma, gewonnen mit den PAXgene Blood ccfDNA Tubes, mithilfe des QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit extrahiert, in 75 µl eluiert und anschließend 1 µl des Eluats einer Größenanalyse mit dem Agilent® Cell-free DNA Screen Tape unterzogen.

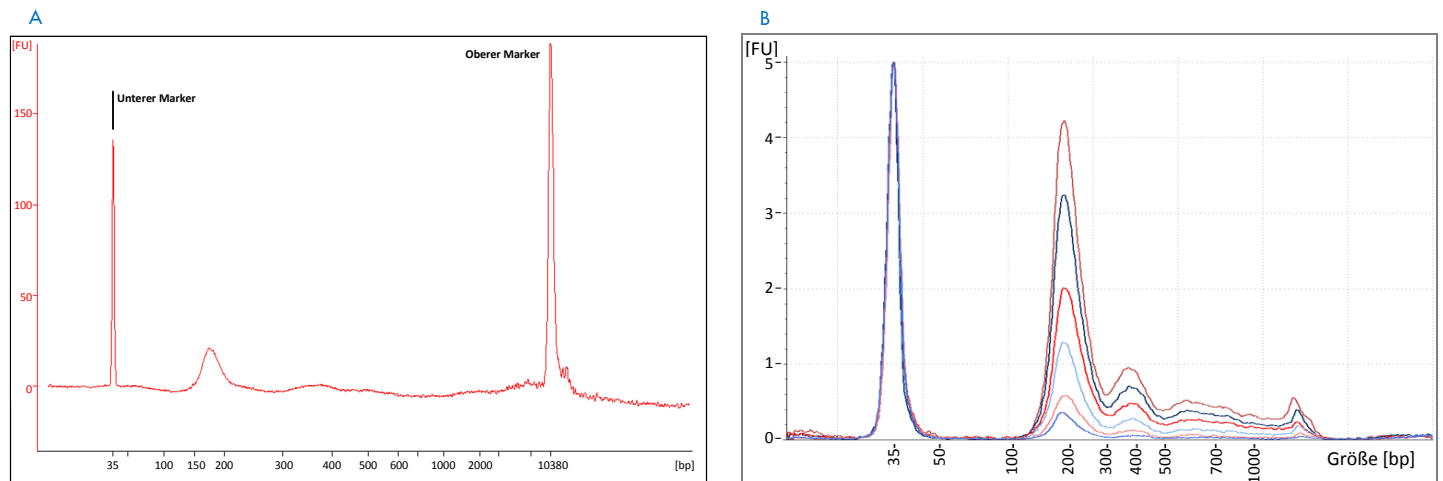


Abbildung 6. Größenverteilung von ccfDNA aus Plasma (auf Bioanalyzer ermitteltes Profil). (A) Die ccfDNA wurde mit dem QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit aus 4 ml EDTA-Plasma extrahiert; 1 µl Eluat wurde mit dem Agilent High Sensitivity DNA Chip analysiert. x-Achse: Basenpaar-Länge (bp); y-Achse: Fluoreszenz-Einheiten (Fluorescence Units, FU). (B) Die ccfDNA wurde mit dem QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit aus 1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml und 10 ml Plasma extrahiert, das mit PAXgene® Blood ccfDNA-Röhrchen gewonnen wurde; 1 µl Eluat wurde einer Analyse mit dem Agilent Cell-free DNA Screen Tape unterzogen. Die sechs Größenprofile in unterschiedlichen Farben veranschaulichen die zunehmende Sensitivität bei der Erkennung der ccfDNA-Größenverteilung in Abhängigkeit vom zur Extraktion verwendeten Plasmavolumen von 1 bis 10 ml. x-Achse: Basenpaargröße (bp); y-Achse: Fluoreszenzeinheiten (FU), Peak bei 35 bp: untere Markierung.

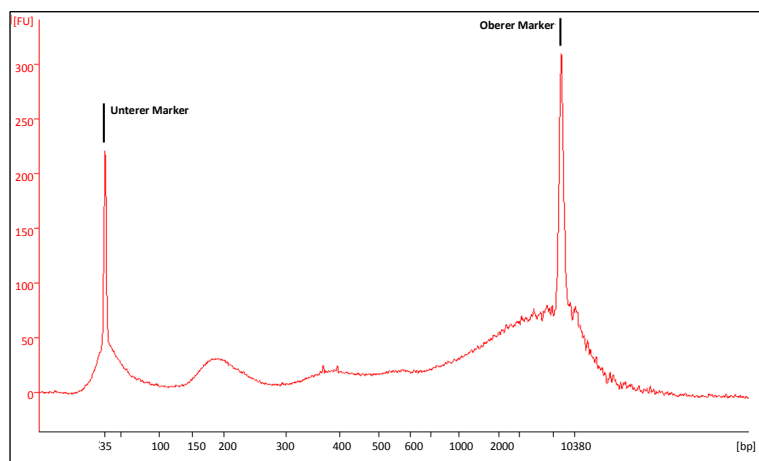


Abbildung 7. Größenverteilung von ccfDNA aus Urin (auf Bioanalyzer ermitteltes Profil). Die ccfDNA wurde mit dem QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit aus 4 ml Urin extrahiert; 1 µl Eluat wurde mit dem Agilent High Sensitivity DNA Chip analysiert. x-Achse: Basenpaar-Länge (bp); y-Achse: Fluoreszenz-Einheiten (Fluorescence Units, FU).

Eluatstabilität

Die Eluatstabilität des QIASymphony DSP Circulating DNA Kit wurde anhand von extrahierter ccfDNA aus einem humanen EDTA-Plasmapool evaluiert. Die Eluate wurden in zwei verschiedenen Elutionsrackformaten gelagert: QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; Kat.-Nr. 19588) und 1,5-ml-Röhrchen vom Typ Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock Tube. Die Eluate wurden in 8 Replikaten analysiert. Die Stabilität der DNA in den Eluaten wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die RNA-Codiersequenz des Ribosoms 18S bestimmt.

Die Stabilität des Eluats bei 2–8 °C wurde weder durch eine Lagerdauer von bis zu einem Monat noch durch das Lagerformat beeinträchtigt (Abbildung 8). Die Stabilität von DNA in LoBind Tubes wurde durch eine Lagerung bei –15 °C bis –30 °C, die 3-maliges Einfrieren und Auftauen nach 7 Tagen, einem Monat und zwei Monaten umfasste, nicht beeinträchtigt (Abbildung 9).

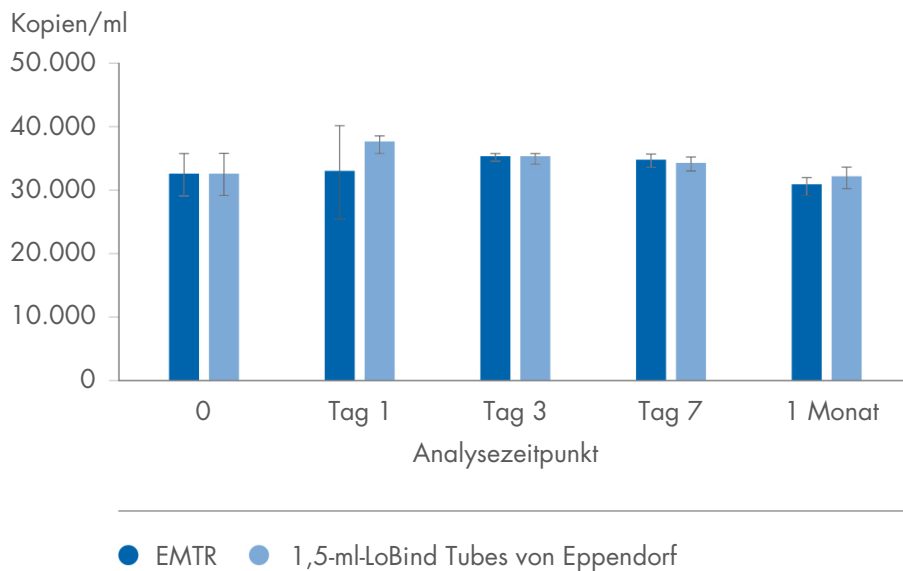


Abbildung 8. Stabilität der ccfDNA in Eluaten, die bei 2–8 °C in zwei Röhrchenformaten gelagert wurden. Die ccfDNA wurde mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit aus EDTA-Plasma extrahiert und danach bei 2–8 °C gelagert und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die die 18S-RNA codierende Sequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je Milliliter Plasma-Eingabevolumen berechnet.

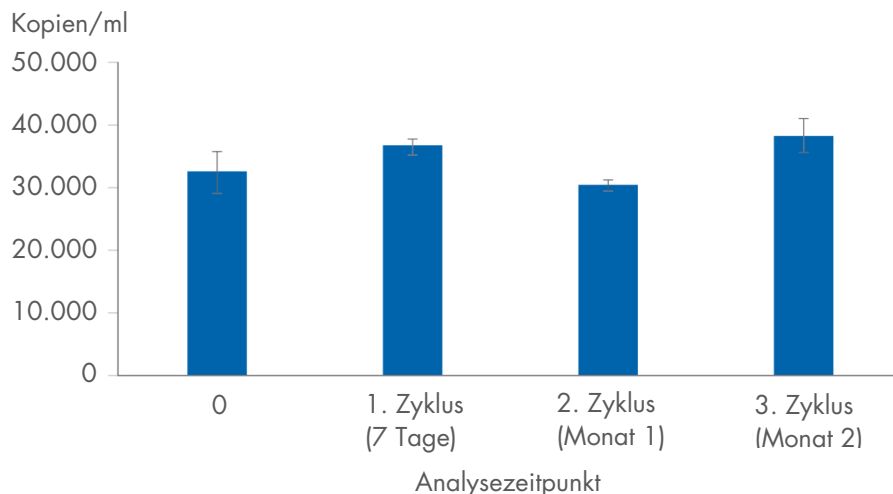


Abbildung 9. Stabilität der ccfDNA in Eluaten, die bei –15 °C bis –30 °C gelagert und 3-mal eingefroren und aufgetaut wurden. Die ccfDNA wurde mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit aus EDTA-Plasma extrahiert und dann in 1,5 ml Eppendorf LoBind Tubes bei –15 °C bis –30 °C gelagert. Die ccfDNA-Ausbeute wurde zu 3 Analysezeitpunkten anhand desselben Eluats nach 3-maligem Einfrieren und Auftauen bestimmt. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die die 18S-RNA codierende Sequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je Milliliter Plasma-Eingabevolumen berechnet.

Störsubstanzen

Humanplasma und -urin wurden mit verschiedenen potenziellen Störsubstanzen versetzt (siehe Tabelle 4), um deren Einfluss auf die ccfDNA-Extraktionsleistung des QS DSP Circulating DNA Kit und die anschließende Kompatibilität mit exemplarischen nachgelagerten Assays zu testen. Eluate wurden mit einer hauseigenen Real-time PCR auf die die 18S-RNA codierende Sequenz und mit dem Qubit® Fluorometer unter Verwendung eines High Sensitivity dsDNA-Assays analysiert.

Tabelle 4. Testkonzentration potenzieller Störsubstanzen

Störsubstanzen	Plasma	Urin
Bilirubin	200 mg/Liter*	200 mg/Liter*
Hämoglobin	2 g/Liter [†]	–
BSA und Gamma-Globin	Bis zu 120 g/Liter*	1 g/Liter [†]
Triglyceride	5 g/Liter*	–
Glucose	10 g/Liter*	10 g/Liter*
Blood	–	1 % [†]
pH	–	pH 4 und pH 9 [†]

* CLSI EP7-A2 Vol. 25 No. 27

[†] FDA Draft Guidance (11.05.2011)

Bei keiner der in Tabelle 4 aufgelisteten Substanzen handelt es sich um Störsubstanzen, mit folgenden Ausnahmen: Plasmaproben mit hohen Konzentrationen an Gammaglobulin (> 30 g/Liter) können zu einer verringerten Ausbeute an zirkulierender zellfreier DNA führen.

Hinweis: Tests wurden anhand beispielhafter nachgelagerter Anwendungen durchgeführt, um die Qualität der extrahierten Nucleinsäuren beurteilen zu können. Verschiedene nachgelagerte Anwendungen können jedoch verschiedene Anforderungen in Bezug auf die Reinheit (d. h. Abwesenheit potenzieller Störsubstanzen) stellen, daher müssen auch die Identifikation und die Tests relevanter Substanzen ebenfalls im Rahmen der Entwicklung der nachgelagerten Anwendung für jeden Arbeitsablauf etabliert werden, bei welchem das QIASymphony DSP Circulating DNA Kit zum Einsatz kommt.

Kreuzkontamination

Das Risiko einer Kreuzkontamination beim QIASymphony DSP Circulating DNA-System wurde für Protokolle mit 1 ml-, 4 ml- und 10 ml Probenvolumen analysiert, die einen, zwei und fünf separate Probenübertragungsschritte mit jeweils 1 ml oder 2 ml Volumen umfassten. Auf dem QIASymphony SP-Gerät wurden drei Läufe mit 96 Proben (1 ml und 4 ml) und sechs Läufe mit 48 Proben (10 ml) durchgeführt. Dabei waren die Chargen alternierend schachbrettartig angeordnet (abwechselnd positive und negative Proben). Für das 1-ml- und 4-ml-Probenvolumen wurden weibliches Plasma (negative Probe) und weibliches Plasma, das mit gescherter männlicher gDNA in einer Konzentration von 1,0E+05 Kopien des SRY1-Gens pro Milliliter Plasma versetzt wurde (positive Probe), als Probenmaterial für ein Modellsystem verwendet. Für das 10-ml-Probenvolumen wurden Plasma (negative Probe) und Plasma, das mit einem 1.000 bp großen DNA-Fragment des GFP-Gens in einer Konzentration von 1,0E+05 Kopien pro Milliliter Plasma versetzt wurde (positive Probe), als Probenmaterial für ein Modellsystem verwendet.

Eine potenzielle Kontamination der negativen Plasmaproben während der Extraktionsläufe wurde anschließend durch Analyse der Eluate unter Verwendung einer Real-time PCR für das Y-Chromosom-spezifische-Gen SRY1 (1-ml- und 4-ml-Protokoll) und für die GFP-spezifische Sequenz (10-ml-Protokoll) untersucht.

Es wurde keine Kreuzkontamination durch Verschleppung zwischen Proben, Chargen oder Läufen nachgewiesen.

Äquivalente ccfDNA-Extraktion mit den drei QIASymphony DSP Circulating DNA Kits

Die äquivalente Leistung mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192), Kat.-Nr. 937556, dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96), Kat.-Nr. 937555, und dem QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192), Kat.-Nr. 937566, wurde anhand von 24 Einzelspendern für die ccfDNA-Extraktion aus 2 ml oder 6 ml Streck-Plasma evaluiert. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die codierende Sequenz der 18S-ribosomalen RNA bestimmt (Abbildung 10).

Die Unterschiede in der Ausbeute (Kopien/ml) spiegeln die starke Spenderabhängigkeit der ccfDNA-Konzentrationen wider, wie sie typischerweise im selben Plasmavolumen vorhanden sind.

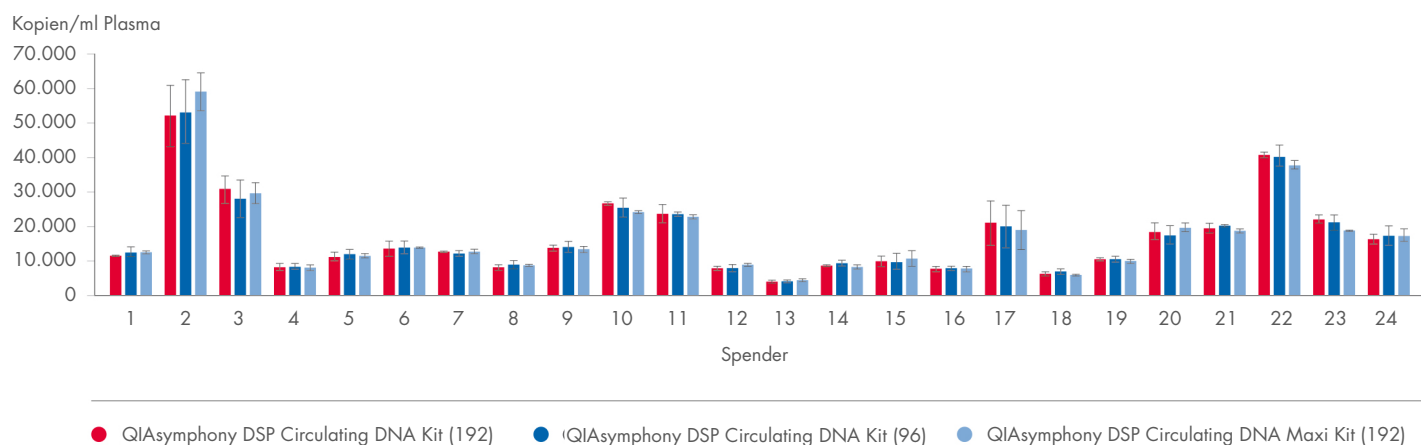


Abbildung 10. Äquivalente ccfDNA-Extraktionseffizienz für die drei QIASymphony DSP Circulating DNA Kits. Die Blutspende von 24 Einzelspendern erfolgte in Cell-Free DNA BCT von Streck. CcfDNA wurde aus 2 ml Plasma mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192) und dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) und aus 6 ml Plasma mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) extrahiert. Mit jedem Kit und für jeden Spender wurde ccfDNA aus drei Replikaten extrahiert, was insgesamt neun Datenpunkte pro Spender ergab. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die die 18S-RNA codierende Sequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je Milliliter Plasma-Eingabevolumen berechnet.

Die Leistung der drei QIASymphony DSP Circulating DNA-Anwendungen ist äquivalent und wird in berechneten Kopien/ml gemessen. Das Verhältnis der Differenz zwischen dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192), dem QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) und dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) ist in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5. Die rücktransformierte Differenz und das zweiseitige 95%-Konfidenzintervall ergeben den Quotienten der geometrischen Mittel (N= 216)

Berechnete Differenz	Schätzung	Untere Grenze des zweiseitigen 95%-KI	Obere Grenze des zweiseitigen 95%-KI
QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) / QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	1,012	0,969	1,057
QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) / QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	1,002	0,960	1,047
QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) / QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192)	1,009	0,964	1,056

Kompatibilität mit verschiedenen nachgelagerten Anwendungen

Bei der Entwicklung des QIASymphony DSP Circulating DNA Kit wurden exemplarische nachgelagerte Anwendungen verwendet, um zu zeigen, dass die isolierten Nukleinsäuren mit einer großen Bandbreite an nachgelagerten Anwendungstechnologien, einschließlich Real-Time PCR, (siehe Abbildungen 1 bis 5 und Abbildungen 8 bis 10), Qubit Fluorometer (Protein-Assay und hochempfindlicher dsDNA-Assay), Bibliothekerstellung (siehe Abbildung 11) und Next Generation Sequencing (NGS), kompatibel sind.

Das Elektropherogramm in Abbildung 11 zeigt ein Beispiel für eine erfolgreiche Adapterligation mit anschließender Amplifikation von ccfDNA. Neben dem auffälligen Peak bei 300 bp für die nukleosomale ccfDNA (ca. 165 plus ca. 70 bp für jeden Adapter) ist auch die dinukleosomale Spitze bei ca. 470 bp sichtbar.

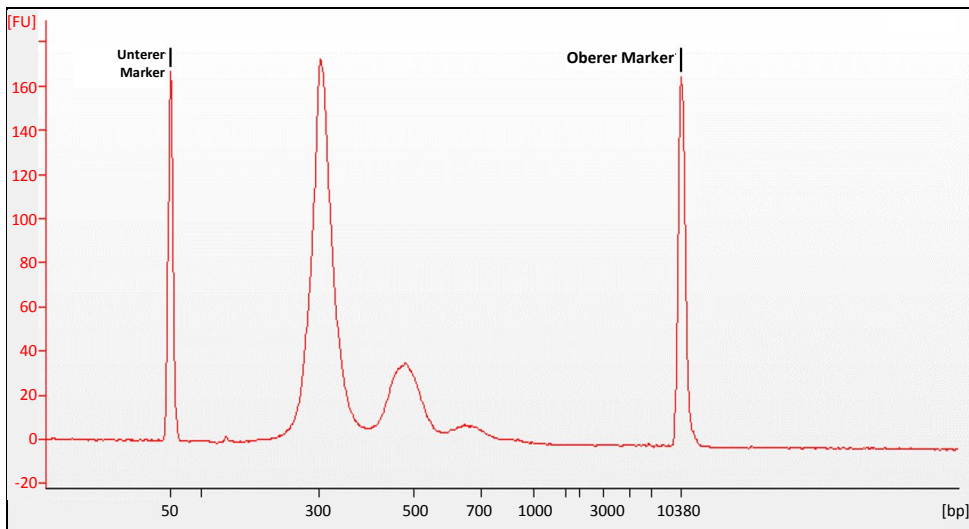






Abbildung 11. DNA-Bibliothek von ccfDNA (Einzelspender), die mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit extrahiert wurde. Die ccfDNA wurde aus Streck-Plasma unter Beachtung des 4-ml-Protokolls extrahiert und anschließend wurden 35 µl Eluat in das NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs) übertragen. Nach der Amplifikation und Aufreinigung mit AMPure XP wurde 1 µl Eluat mit dem Agilent 7500 DNA Kit analysiert.

Symbole

Die folgenden Symbole werden in der Gebrauchsanweisung oder auf der Verpackung und Kennzeichnung verwendet:

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

Bearbeitungsverlauf

Revision

Beschreibung

R1, Juni 2022

Version 2, Revision 1

- Aktualisierung auf Version 2 für die Compliance mit der IVDR
- Abschnitt hinzugefügt zu Störsubstanzen, Kreuzkontamination und Kompatibilität mit nachgelagerten Anwendungen

R2, Juni 2024

- Die Dokumentversion wurde aus dem Bearbeitungsverlauf entfernt
- Aktualisierung zum Hinzufügen der Leistungsdaten für das QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) und das QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) in Kombination mit BioScripts für 6 ml, 8 ml und 10 ml Probenvolumen.
- Hinzufügen der Leistungsdaten für BioScript für 1 ml Probenvolumen

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- 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® (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 oder seine Tochtergesellschaften); PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX; Eingetragene Namen, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

HB-3034-D01-002 © 2024 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.