



Juni 2022

# QIAsymphony® DSP Circulating DNA Kit Gebrauchsanweisung (Leistungsmerkmale)

Version 2



Für in-vitro-diagnostische Anwendungen  
Zur Verwendung mit dem QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Deutschland

R1

Leistungsmerkmale sind online unter der Registerkarte „Resource“ (Ressource) auf der Produktseite unter [www.qiagen.com](http://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. 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 wurden die Leistungsmerkmale bestimmt, diese sind 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.

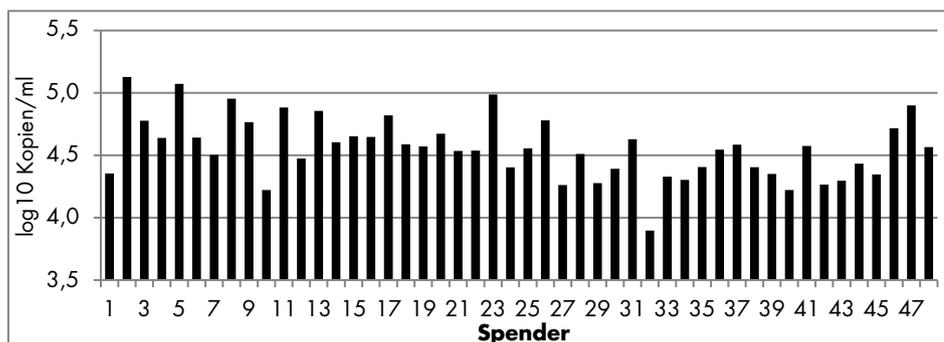
Der QIASymphony SP führt alle Schritte des Aufreinigungsprotokolls aus. Bis zu 96 Proben, jeweils in Chargen von bis zu 24 Stück, können in einem Lauf verarbeitet werden. Bei Urinproben kann eine manuelle Vorbehandlung erforderlich sein.

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 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. Daher obliegt es dem Anwender, den gesamten Arbeitsablauf zu validieren, um geeignete Leistungsparameter festzulegen.

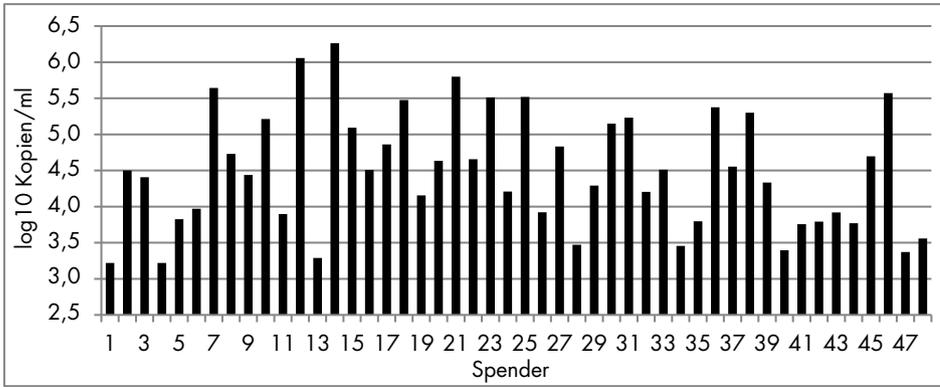
## Grundlegende Leistungscharakteristik

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 ( $\log_{10}$  Kopien/ml) spiegeln die starke Spenderabhängigkeit der ccfDNA-Konzentration bei gleichem Volumen des jeweiligen Probenmaterials wider.



**Abbildung 1. ccfDNA-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 ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die 18S-Codiersequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je Milliliter Plasma-Eingabevolumen berechnet.



**Abbildung 2. Die ccfDNA-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 ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die 18S-Codiersequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je Milliliter Urin-Eingabevolumen berechnet.

## Laufpräzision

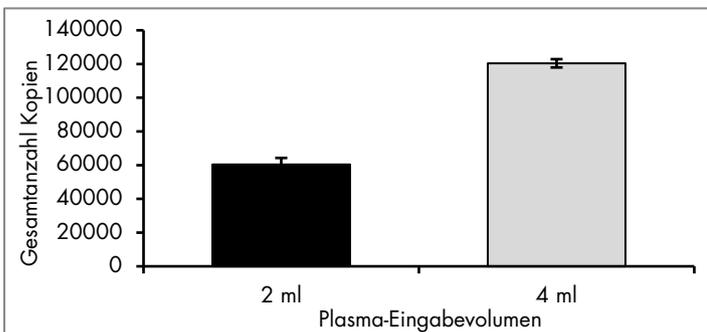
Es wurden Variationskoeffizienten (VK) für die Extraktion von humaner ccfDNA aus EDTA-Plasma bestimmt. Für die Präzisionsanalyse wurde die ccfDNA mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assays für die RNA-Codiersequenz des Ribosoms 18S quantitativ bestimmt. Es wurden insgesamt je 10 QIASymphony Läufe in 4 Chargen (8 Replikate je Charge) durchgeführt. Die Präzisionsdaten sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1. Auswertung der Präzisionsuntersuchungen**

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

## Leistungsäquivalenz der Protokolle für 2 ml und 4 ml

Die Leistungsäquivalenz der Protokolle für 2-ml- und 4-ml-Probenaufgabevolumen wurde für den 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 18S-Codiersequenz bestimmt (Abbildung 3). Das Verhältnis der Differenz der 2-ml- und 4-ml-Protokolle ist in Tabelle 2 gezeigt. (Das Referenzprotokoll ist 4-ml-Probeneingabe).



**Abbildung 3. Leistungsäquivalenz bei Anwendung der Protokolle für 2 ml und 4 ml Probenaufgabevolumen.** Der lineare Bereich des ccfDNA-Protokolls wurde anhand der Protokolle für 2 ml und 4 ml bestimmt. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die 18S-Codiersequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Kopien-Gesamtanzahl je Protokoll berechnet.

Tabelle 2. Differenz zwischen den Protokollen für 2 ml und 4 ml (N = 256)

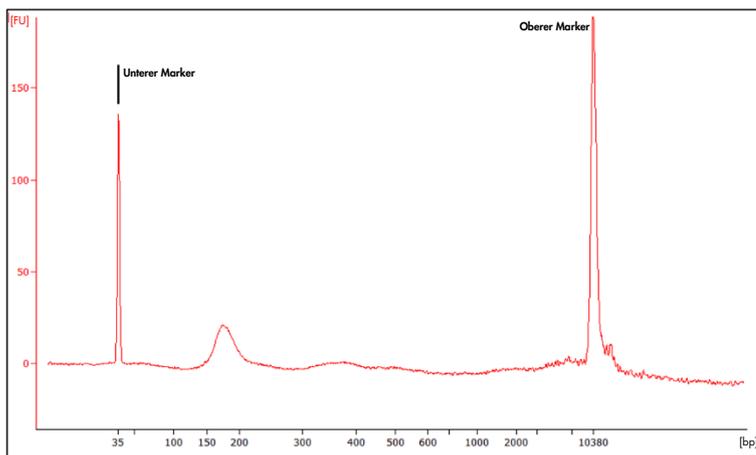
Parameter	Wert
Geschätzter Quotient des als Kopien/ml berechneten geometrischen Mittelwerts	1,01
Untere 95%-Konfidenzgrenze	0,92
Obere 95%-Konfidenzgrenze	1,11
Gesamtpräzision	14,12

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

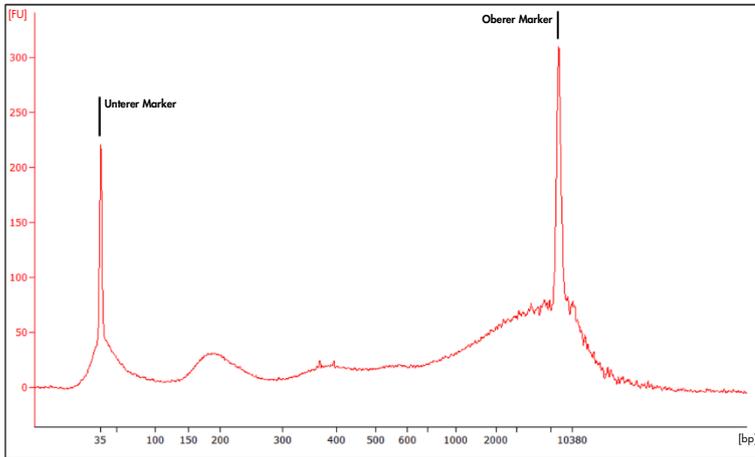
## Größenverteilung

Zur Evaluierung der Größenverteilung der Probenausgabe wurde ccfDNA mit dem QIAasymphony 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. Es wurden insgesamt 5 unabhängige Replikate durchgeführt. Ein repräsentatives DNA-Profil für Plasma ist in [Abbildung 4](#) und eines für Urin in [Abbildung 5](#) dargestellt.

Das Elektropherogramm für Plasma in [Abbildung 4](#) 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 5](#) 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 5](#) eine hohe Zahl von langen DNA-Fragmenten ab ca. 2.000 bp. Solche genomischen DNA-Fragmente sind bei Urinproben häufig in großer Menge zu beobachten, höchstwahrscheinlich, weil im Urin vorhandene Zellen genomische DNA freisetzen.



**Abbildung 4. Größenverteilung von ccfDNA aus Plasma (auf Bioanalytiker ermitteltes Profil).** 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).

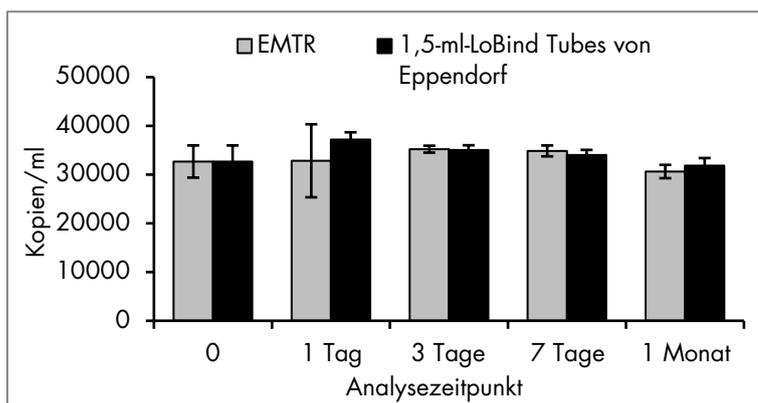


**Abbildung 5. Größenverteilung von cfDNA aus Urin (auf Bioanalyser ermitteltes Profil).** Die cfDNA wurde mit dem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit aus 4 ml Urin extrahiert; 1 µl Eluat wurde mit dem Agilent High Sensitivity DNA Chip analysiert. x-Achse: Basenpaar-Länge (bp); y-Achse: Fluoreszenz-Einheiten (Fluorescence Units, FU).

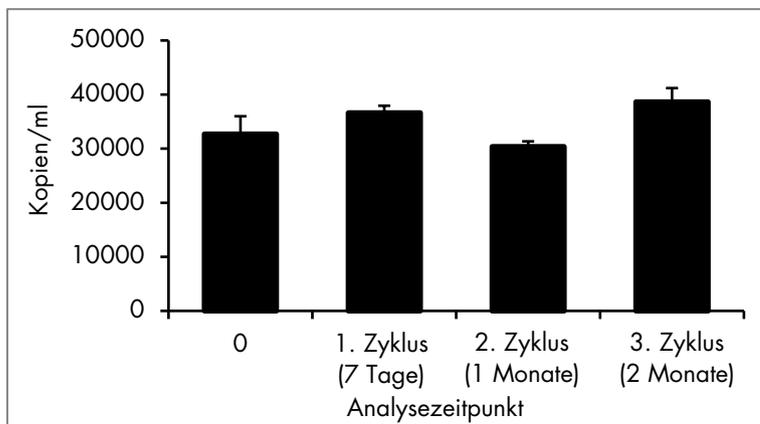
## Eluatstabilität

Die Eluatstabilität des QIASymphony DSP Circulating DNA Kit wurde anhand von extrahierter cfDNA 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 6). 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 (Abbildung 7).



**Abbildung 6. Stabilität der cfDNA in Eluaten, die bei 2–8 °C in zwei Röhrchenformaten gelagert wurden.** Die cfDNA 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 cfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die 18S-Codiersequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je Milliliter Plasma-Eingabevolumen berechnet.



**Abbildung 7. Stabilität der ccfDNA in Eluaten, die bei  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  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  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die ccfDNA-Ausbeute wurde zu 3 Analysezeitpunkten anhand desselben Eluats unter 3-maligem Einfrieren und Auftauen bestimmt. Die ccfDNA-Ausbeute wurde mit einem hauseigenen Real-time PCR-Assay für die 18S-Codiersequenz quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Zielkopien je Milliliter Plasma-Eingabevolumen berechnet.

## Störsubstanzen

Humanplasma und -urin wurden mit verschiedenen potenziellen Störsubstanzen gespikt (siehe Tabelle 3), um ihren Einfluss auf die ccfDNA-Extraktionsleistung des QS DSP Circulating DNA Kit und die anschließende Kompatibilität des exemplarischen nachgelagerten Assays zu testen. Eluate wurden anhand einer internen Real-time PCR für die Kodiersequenz 18S und mit dem Qubit® Fluorometer unter Verwendung eines High Sensitivity dsDNA Assay analysiert.

**Tabelle 3. Testkonzentrationen potenziell interferierender Substanzen**

Störsubstanzen	Plasma	Urin
Bilirubin	200 mg/Liter*	200 mg/Liter*
Hämoglobin	2 g/Liter <sup>1</sup>	-
BSA und Gamma-Globin	Bis zu 120 g/Liter*	1 g/Liter <sup>†</sup>
Triglyceride	5 g/Liter*	-
Glucose	10 g/Liter*	10 g/Liter*
Blut	-	1 % <sup>†</sup>
pH	-	pH 4 und pH 9 <sup>†</sup>

\* CLSI EP7-A2 Vol. 25 No. 27

<sup>†</sup> FDA Draft Guidance (11.05.2011)

Bei keiner der in Tabelle 3 gelisteten Substanzen handelt es sich um Störsubstanzen, lediglich Plasmaproben mit hohen Konzentrationen an Gammaglobulin ( $> 30\text{ g/Liter}$ ) können zu einer verringerten Ausbeute an zirkulierender zellfreier DNA führen.

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

## Kreuzkontamination

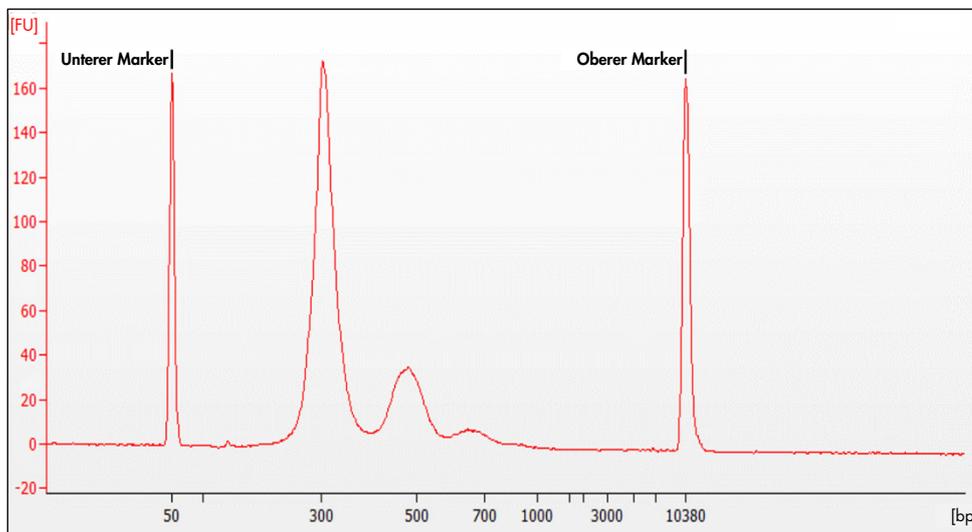
Das Risiko einer Kreuzkontamination des QIASymphony DSP Circulating DNA System wurde anhand von drei Läufen mit 96 Proben auf dem QIASymphony SP mit abwechselnd schachbrettartig angeordneten Chargen (abwechselnd positive und negative Proben) analysiert. Weibliches Plasma (negative Probe) und weibliches Plasma, das mit gescherter männlicher gDNA mit einer Konzentration von  $1,0E+05$  Kopien des SRY1-Gens pro Milliliter Plasma gespikt wurde (positive Probe), wurden als Probenmaterial für ein Modellsystem verwendet. Die Probenvorbereitung erfolgte anhand des 4-ml-Protokolls, das zwei getrennte Proben transfers mit einem Volumen von jeweils 2 ml umfasste. Eine potenzielle Kontamination der negativen Proben weiblichen Plasmas während der Extraktionsläufe wurde anschließend durch Analyse der Eluate unter Verwendung einer Echtzeit-PCR für das Y-Chromosom-spezifische-Gen SRY1 evaluiert.

Es wurde keine Kreuzkontamination bei Verschleppungen zwischen Proben, Chargen oder Läufen nachgewiesen.

## 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 Abbildung 1, Abbildung 2, Abbildung 3, Abbildung 6 und Abbildung 7), Qubit Fluorometer (Protein-Assay und hochempfindlicher dsDNA-Assay), Bibliothek (siehe Abbildung 8) und Next Generation Sequencing (NGS), kompatibel sind.

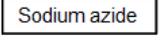
Das Elektropherogramm in Abbildung 8 zeigt ein Beispiel für eine erfolgreiche Adapterligation und anschließende Amplifikation von ccfDNA. Neben dem auffälligen Peak bei 300 bp für die nukleosomale ccfDNA (ca. 165 plus ca. 70 bp für jeden Adapter) ist auch die dinukleosomale Spitze bei ca. 470 bp sichtbar.



**Abbildung 8. 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 wurde 35- $\mu$ l-Eluat in das NEBNext<sup>®</sup> Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs) extrahiert. Nach der Amplifikation und Aufreinigung mit AMPure XP wurde 1- $\mu$ l-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
	Inhalt ausreichend für <N> Reaktionen
	Verfallsdatum
	Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der europäischen Verordnung 2017/746 über In-vitro-Diagnostika.
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargennummer
	Materialnummer (Kennzeichnung von Komponenten)
	Komponenten
	Enthält
	Anzahl
	Internationale Artikelnummer (Global Trade Item Number, GTIM)
Rn	R steht für Revision der Gebrauchsanweisung, n ist die Revisionsnummer
	Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller
	Gebrauchsanweisung beachten
	Warnung/Vorsicht
	Proteinase K
	Kavitätsnummer (d. h. Kavität der Reagenzienkartusche)
	Reagenzienkartusche
	Natriumazid

Symbol

Bedeutung des Symbols

**EtOH**

Ethanol

**UDI**

Unique Device Identifier (eindeutige Geräteerkennung)

## Bearbeitungsverlauf

Revision	Beschreibung
R1, Juni 2022	Version 2, Revision 1 <ul style="list-style-type: none"><li>• Aktualisierung auf Version 2 für die Compliance mit der IVDR</li><li>• Abschnitt hinzugefügt zu Störsubstanzen, Kreuzkontamination und Kompatibilität mit nachgelagerten Anwendungen</li></ul>

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit-Handbuch oder Benutzerhandbuch. QIAGEN Kit-Handbücher und Benutzerhandbücher sind unter [www.qiagen.com](http://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 Tochtergesellschaften). Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen

