

---

August 2015

# QIAsymphony<sup>®</sup> DSP DNA Kits: Leistungscharakteristik

Dieses Dokument enthält die *QIAsymphony DSP DNA Kits: Leistungscharakteristik*, R4, für  
Kitversion 1

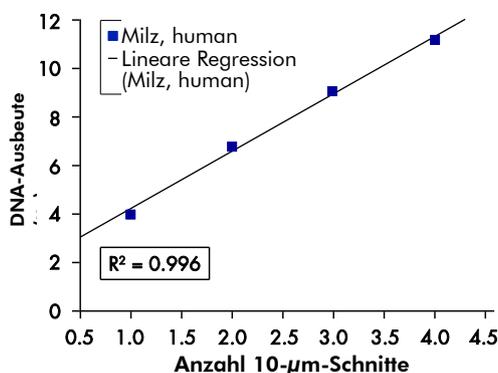
Die QIASymphony® DSP DNA Kits sind ausschließlich für den Gebrauch in Kombination mit dem QIASymphony SP vorgesehen. Die QIASymphony DSP DNA Mini Kits enthalten die Reagenzien für die automatisierte Reinigung von Gesamt-DNA aus menschlichem Vollblut, Buffy Coat, Gewebe und formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben sowie von viraler DNA aus menschlichem Vollblut. Die QIASymphony DSP DNA Midi Kits enthalten die Reagenzien für die automatisierte Reinigung von Gesamt-DNA aus menschlichem Vollblut und Buffy Coat.

## FFPE-Gewebeproben und Gewebe

### Linearer Wertebereich

Der lineare Wertebereich des QIASymphony DSP DNA FFPE Kits für die Gewebe-Applikation wurde mithilfe von sechs Wiederholproben von eins bis vier frischen FFPE-Gewebeschnitten (Dicke jeweils 10 µm) der menschlichen Milz bestimmt. Die DNA-Extraktion wurde unter Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini Kits nach dem Tissue-Low-Content-DSP-Protokoll durchgeführt. Zur Entparaffinierung und Lyse wurde die Vorbehandlungsmethode mit Xylol/Ethanol angewendet. Die DNA-Elution erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer und die DNA-Ausbeute wurde durch spektroskopische Analyse bestimmt (siehe Abb. 1).

(Figure 1).

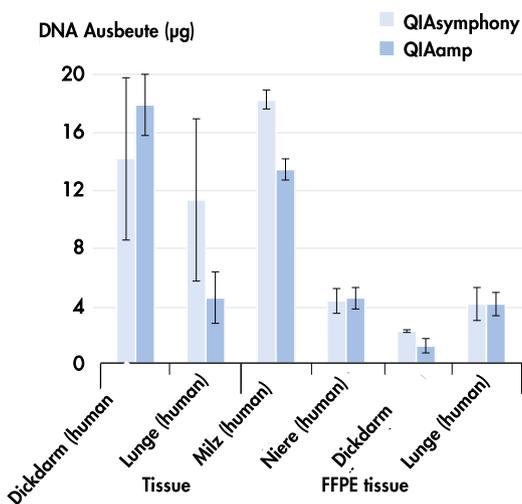


**Abbildung 1. Linearer Wertebereich der DNA-Extraktion aus FFPE-Gewebeschnitten.** Sechs Wiederholproben von eins bis vier 10 µm dicken FFPE-Gewebeschnitten der menschlichen Milz wurden durch Xylol-/Ethanol-Vorbehandlung entparaffiniert. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIASymphony SP unter Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini Kits nach dem Tissue-Low-Content-DSP-Protokoll mit einem Elutionsvolumen von 50 µl.

### Vergleich der Leistungsfähigkeit

Die Leistungsfähigkeit des QIASymphony DSP DNA Mini Kits wurde mit der Leistungsfähigkeit der manuellen DNA-Extraktion verglichen, die mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit oder dem QIAamp DSP DNA Mini Kit unter Verwendung von FFPE-Gewebeschnitten bzw. frischem oder

gefrorenem Gewebe als Probenmaterial durchgeführt wurde. Manuelle und automatisierte Probenverarbeitungen sowie Quantifizierung der DNA-Ausbeuten erfolgten simultan. Die DNA-Ausbeuten nach Extraktion aus frischen/gefrorenen bzw. FFPE-Gewebeproben mithilfe des QIASymphony DSP DNA Mini Kits, des QIAamp DSP DNA Mini Kits (Gewebe) und des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits (FFPE-Gewebeproben) sind in Abbildung 2 (auf Seite 5) wiedergegeben.



**Figure 2. DNA extraction from tissue and FFPE tissue samples.** Bei den frischen/gefrorenen Gewebeproben handelte es sich um 6 x 25 mg Stücke menschlichen Lungen- bzw. Dickdarmgewebes. Drei Proben jedes Gewebetyps wurden für die Probenverarbeitung mit dem QIASymphony SP nach dem Tissue-High-Content-DSP-Protokoll verwendet. Die DNA-Extraktion der übrigen Proben erfolgte mit dem QIAamp DSP DNA Mini Kit. Die DNA wurde mit 200 µl eluiert und die DNA-Ausbeute durch spektroskopische Analyse bestimmt. Für die DNA-Extraktion aus FFPE-Gewebeproben wurden insgesamt 12 Wiederholproben verwendet, die jeweils aus drei Schnittpräparaten verschiedener menschlicher Organe von jeweils 10 µm Dicke bestanden. Sechs Proben wurden für die Probenverarbeitung mit dem QIASymphony SP verwendet, wobei nach der Vorbehandlung mit Entparaffinierungslösung das Tissue-Low-Content-DSP-Protokoll angewendet wurde. Die DNA wurde mit 50 µl eluiert und die DNA-Ausbeute durch spektroskopische Analyse bestimmt. Die Säulen geben die absolute DNA-Ausbeute mit Standardabweichung wieder..

## Analyse des Mutationsstatus von Biomarkern durch Real-Time-PCR

Für die Analyse des Mutationsstatus von Biomarkern wurde die DNA verwendet, die aus FFPE-Schnitten menschlichen Dickdarmgewebes bzw. aus Proben menschlichen Lungengewebes extrahiert worden war.

Für die DNA-Extraktion aus FFPE-Gewebeproben wurden drei 10 µm dicke Schnittpräparate menschlichen Dickdarmgewebes für die Probenverarbeitung eingesetzt.. Nach einer Vorbehandlung mit Entparaffinierungslösung wurde die DNA-Extraktion nach dem Tissue-Low-Content-DSP-Protokoll mit einem Elutionsvolumen von 100 µl durchgeführt. Für die DNA-Extraktion aus FFPE-Gewebeproben wurden drei 10 µm dicke Schnittpräparate menschlichen

Dickdarmgewebes für die Probenverarbeitung eingesetzt. Für die DNA-Extraktion aus gefrorenen Gewebeproben wurde 25 mg menschliches Lungengewebe eingesetzt, das unter Verwendung des Tissue-High-Content-DSP-Protokolls und eines Elutionsvolumens von 200 µl verarbeitet wurde.

Für die DNA-Extraktion aus gefrorenen Gewebeproben wurde 25 mg menschliches Lungengewebe eingesetzt, das unter Verwendung des Tissue-High-Content-Protokolls und eines Elutionsvolumens von 200 µl verarbeitet wurde. Die anschließende Mutationsanalyse erfolgte auf den Biomarker EGFR. Kontroll- und Mutationsnachweis-Assays wurden wie im Handbuch zum *therascreen*<sup>®</sup> EGFR RGQ PCR Kit beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse ergaben eine Deletion innerhalb des EGFR-Gens, was sich an einem  $\Delta C_T$ -Wert von 2,47 zeigte, der unter dem definierten Cut-off-Wert von 12 für den Nachweis einer Mutation lag (siehe Tabelle 2, Seite 5).

Tabelle 1. Ergebnisse der Mutationsanalyse des Biomarkers KRAS in FFPE-Gewebeproben

Probe	Reaktion	$C_T$ Target	$C_T$ interne Kontrolle	$\Delta C_T^*$
Kontrolle ohne Template	Control	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	Control	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-Gewebeproben (Dickdarm, Mensch)	Control	24.94	31.98	–
	12ALA	n.d.	32.42	–
	12ASP	n.d.	32.73	–
	12ARG	n.d.	33.05	–
	12CYS	n.d.	32.74	–
	12SER	29.11	32.34	4.17
	12VAL	n.d.	32.81	–
	13ASP	n.d.	33.20	–

\*  $\Delta C_T = M C_T - C C_T$ , wobei M = Mutation und C = Kontrolle; n.d. = nicht detektiert.

Tabelle 2. Ergebnisse der Mutationsanalyse des Biomarkers EGFR in gefrorenen Gewebeproben

Probe	Reaktion	C <sub>T</sub> Target	C <sub>T</sub> interne Kontrolle	ΔC <sub>T</sub> *
Kontrolle ohne Template (*No Template Control)	Control	0.00	31.71	–
	T790M	0.00	32.36	–
	Deletions	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	Control	28.78	31.05	–
	T790M	30.08	31.13	1.30
	Deletions	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 (Lunge, Mensch)	Control	25.76	31.23	–
	T790M	n.d.	31.99	–
	Deletions	28.23	30.99	2.47
	L858R	n.d.	31.33	–
	L861Q	n.d.	31.98	–
	G719X	n.d.	32.06	–
	S768I	n.d.	31.88	–
	Ins	n.d.	31.62	–

\*  $\Delta C_T = M C_T - C C_T$ , wobei M = Mutation und C = Kontrolle; n.d. = nicht detektiert.

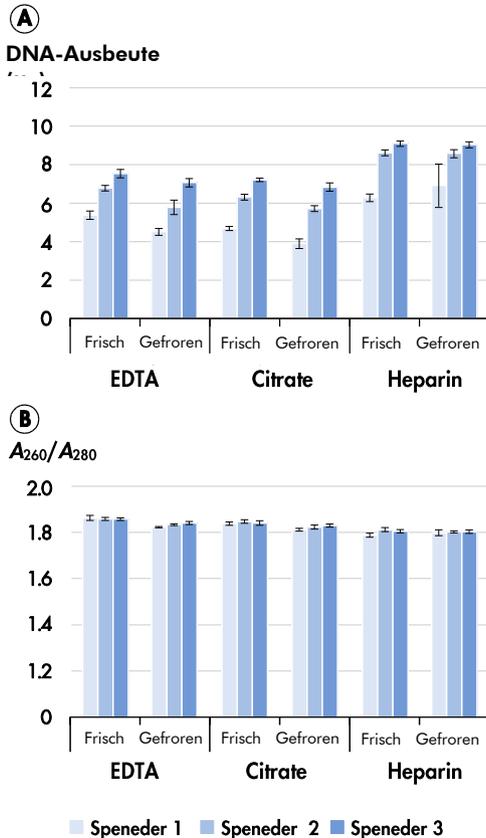
## Blut und Buffy Coat

Die Bestimmung der Leistungscharakteristik für Blut- und Buffy-Coat-Applikationen wurde mit Blutproben von Spendern mit einer Leukozytenzahl im Bereich von 4,0 bis 11,0 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml bzw. Buffy-Coat-Proben von Spendern mit einer Leukozytenzahl von 2,5 bis 5,5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml durchgeführt.

## DNA-Ausbeute und -Reinheit

Die grundsätzliche Funktionalität des QIASymphony DSP DNA Mini Kits wurde unter Verwendung verschiedener Blutentnahmeröhrchen und Antikoagulanzen sowie mit frischem und gefrorenem menschlichem Vollblut evaluiert. Die Vollblutproben wurden bei drei Spendern mit den folgenden drei Röhrchentypen entnommen. EDTA = BD™ Vacutainer®, 10 ml, 16 x 100 mm (Antikoagulans: K2-EDTA); Citrat = BD 9NC Röhrchen, 2,7 ml, 13 x 75 mm (Antikoagulans: Citrat); Heparin = Sarstedt® S-Monovette®, 7,5 ml, 15 x 92 mm (Antikoagulans: Li-Heparin). Es wurden

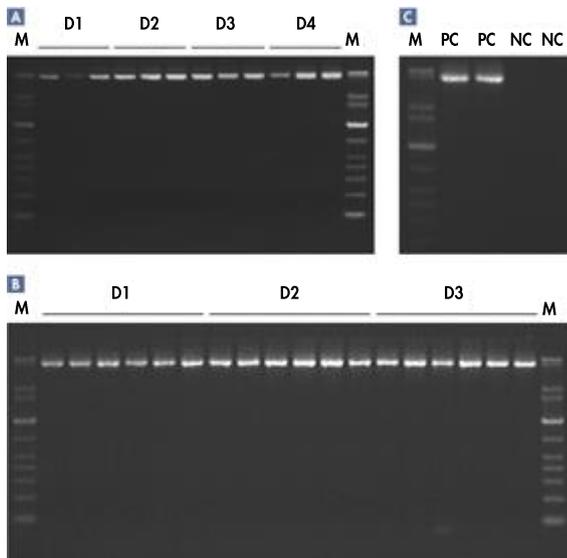
entweder frische (bei 5 °C gelagert) oder gefrorene Blutproben (nach Lagerung bei –20 °C) verarbeitet. Die genomische DNA wurde aus 200-µl-Proben, mit 4 Wiederholproben pro Spender und Röhrchentyp, mit dem QIASymphony DSP DNA Mini Kit nach dem „Blood 200 DSP“-Protokoll mit einem Elutionsvolumen von 200 µl isoliert. Die DNA-Ausbeute und -Reinheit wurden jeweils durch spektroskopische Analyse bestimmt (siehe Abb. 3).



**Abbildung 3. System-Robustheit bei Verwendung verschiedener Entnahmeröhrchen und Antikoagulanzen mit frischem bzw. gefrorenem menschlichem Vollblut als Ausgangsmaterial.** **A** DNA-Ausbeute, die Säulen geben die absolute DNA-Ausbeute mit Standardabweichung wieder. **B** DNA-Reinheit, die Säulen geben die DNA-Reinheit mit Standardabweichung wieder.

### DNA-Integrität

In einer PCR (Ansatzvolumen 50 µl) wurden Long-Range-PCR-Produkte (5 kb) mithilfe des QIAGEN LongRange PCR Kits amplifiziert. (siehe Abb. 4, Seite 7).



**Abbildung 4. Untersuchung der DNA-Integrität mittels Long-Range-PCR.** **A** Vollblut wurde in BDK2E-Röhrchen von 4 gesunden Spendern (S) entnommen. Die für die Long-Range-PCR eingesetzte genomische DNA wurde jeweils aus 200- $\mu$ l Aliquots (drei Wiederholproben) mithilfe des QIASymphony DSP DNA Mini Kits nach dem „Blood 200 DSP“-Protokoll mit einem Elutionsvolumen von 200  $\mu$ l gereinigt. S1 = Spender 1, S2 = Spender 2, S3 = Spender 3 und S4 = Spender 4. **B** Vollblut wurde in BDK2E-Röhrchen von 3 gesunden Spendern entnommen und die Buffy-Coat-Fraktion präpariert. Für die Long-Range-PCR wurde daraus die genomische DNA jeweils aus 200- $\mu$ l Aliquots (sechs Wiederholproben) mithilfe des QIASymphony DSP DNA Mini Kits nach dem „Buffy Coat 200 DSP“-Protokoll mit einem Elutionsvolumen von 200  $\mu$ l gereinigt. S1 = Spender 1, S2 = Spender 2 und S3 = Spender 3. **C** Kontrollen: PC = Positivkontrolle und NC = Negativkontrolle.

## Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit

Die DNA-Extraktion wurde nach dem „Blood 200 DSP“-Protokoll mit einem Elutionsvolumen von 200  $\mu$ l durchgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde von einem Laboranten evaluiert, indem drei unabhängige Läufe (mit jeweils 96 Proben, wobei jeder Lauf aus 4 Chargen à 24 Proben bestand) an drei verschiedenen Tagen durchgeführt wurden (siehe Tabellen 3 und 4, Seite 8).

Die Reproduzierbarkeit wurde evaluiert, indem drei unabhängige Läufe (mit jeweils 96 Proben) an drei verschiedenen Tagen von drei unterschiedlichen Laboranten mit verschiedenen QIASymphony SP Geräten durchgeführt wurden, wobei jeder Lauf aus 4 Chargen à 24 Proben bestand (siehe Tabellen 5 und 6, Seiten 8 und 9).

**Tabelle 3. Ergebnisse der Evaluierung der Wiederholbarkeit**

Lauf	Charge	N	Mittlere DNA-Ausbeute (µg)	SD	CV
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 Wiederholproben; SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

**Tabelle 4. Präzisionsdaten für die Evaluierung der Wiederholbarkeit**

	SD	CV
<b>Inter-Chargen-Präzision im selben Lauf</b>	0,25	4,95
<b>Gesamt-Wiederholpräzision</b>	0,26	5,18

\* SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

**Tabelle 5. Ergebnisse der Evaluierung der Reproduzierbarkeit**

Lauf	Charge	N	Mittlere DNA-Ausbeute (µg)	SD	CV
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 Wiederholproben; SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

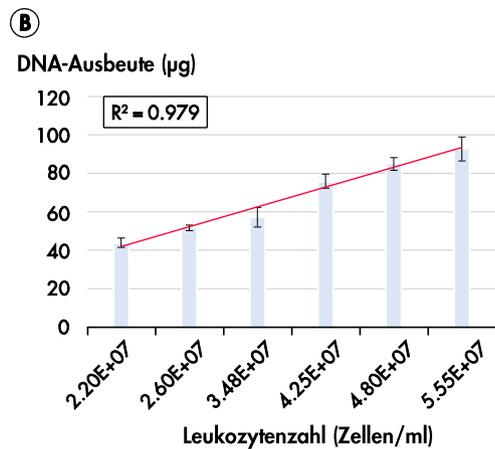
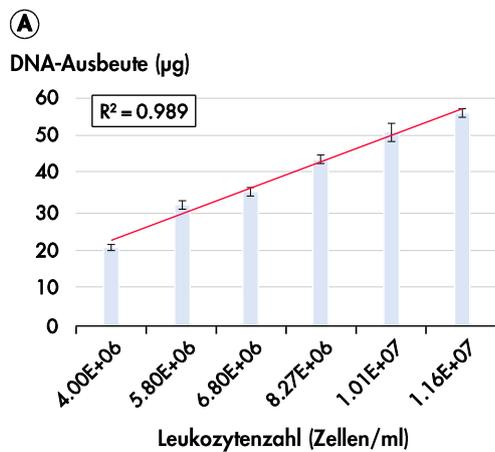
**Tabelle 6. Präzisionsdaten für die Evaluierung der Reproduzierbarkeit**

	<b>SD</b>	<b>CV</b>
<b>Inter-Chargen-Präzision im selben Lauf</b>	0,25	4,73
<b>Gesamt-Wiederholpräzision</b>	0,38	7,03

\* SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

### Linearer Wertebereich

Die linearen Wertebereiche für die Blut- und Buffy-Coat-Applikationen der QIASymphony DSP DNA Kits wurden unter Verwendung von Blut- und Buffy-Coat-Proben mit sechs unterschiedlichen Leukozytenzahlen für jeden Probenotyp ermittelt. Bei den Vollblutproben lagen die Leukozytenzahlen zwischen  $4 \times 10^6$  Zellen/ml und  $11,6 \times 10^6$  Zellen/ml und bei den Buffy-Coat-Proben zwischen  $2,2 \times 10^7$  Zellen/ml und  $5,6 \times 10^7$  Zellen/ml. Die DNA-Ausbeuten wurden durch spektroskopische Analyse bestimmt und gegen die Leukozytenzahl aufgetragen (siehe Abb. 5).

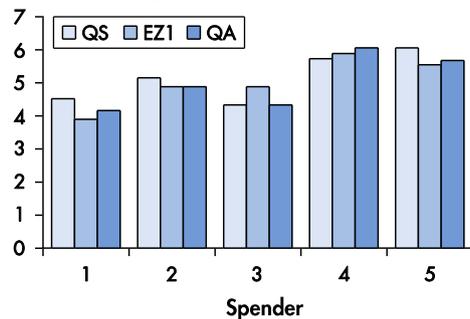


**Abbildung 5. Linearer Wertebereich der DNA-Extraktion aus Blut und Buffy Coat.** A Die genomische DNA wurde aus 1 ml Vollblut mit dem QIAasymphony DSP DNA Midi Kit nach dem „Blood 1000 DSP“-Protokoll mit einem Elutionsvolumen von 500 µl isoliert. Die Säulen geben die absolute DNA-Ausbeute mit Standardabweichung wieder. B Die genomische DNA wurde aus 400 µl Buffy Coat mit dem QIAasymphony DSP DNA Midi Kit nach dem „Buffy Coat 400 DSP“-Protokoll mit einem Elutionsvolumen von 400 µl isoliert. Die Säulen geben die absolute DNA-Ausbeute mit Standardabweichung wieder.

## Vergleich der Leistungsfähigkeit

Die Leistungsfähigkeit des QIAasymphony DSP DNA Systems für Blut-Applikationen wurde im Vergleich zum EZ1® DSP DNA Blut-System und zur manuellen DNA-Präparation mithilfe des QIAamp® DNA Blood Mini Kits untersucht. Die DNA wurde aus verschiedenen Blutproben isoliert, anschließend die DNA-Ausbeute bestimmt (siehe Abb. 6) und in einer Analyse unter Verwendung des CE-gekennzeichneten *artus*® MTHFR LC PCR Kits (24) eingesetzt (siehe Tabelle 7, Seite 14 f.).

### DNA-Ausbeute (µg)



**Abbildung 6. Vergleich der DNA-Ausbeuten zwischen verschiedenen DNA-Reinigungs-systemen für Blutproben.** Vollblut von fünf gesunden Spendern wurde in BDR-Röhrchen (mit K2E-EDTA als Antikoagulans) entnommen. Bei allen Methoden wurden ein Ausgangs-Probenvolumen von 200 µl und ein Elutionsvolumen von 200 µl verwendet. QS = DNA-Präparation mit QIAAsymphony SP und QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit nach dem „DSP DNA Blood 200“-Protokoll; EZ1 = DNA-Präparation mit EZ1 Advanced XL und EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA = manuelle DNA-Präparation mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit. Die Säulen repräsentieren die absolute DNA-Ausbeute für jede Probe. Tabelle 7. Polymorphismen bei den Nucleotiden (Nt.) 667 und 1298 des MTHFR-Gens nach Detektion mithilfe des artus MTHFR LC PCR Kits

**Tabelle 7. Polymorphismen bei den Nucleotiden (Nt.) 667 und 1298 des MTHFR-Gens nach Detektion mithilfe des artus MTHFR LC PCR Kits**

Donor	Method	nt 677	nt 1298	Genotype result
1	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	WT677/WT677 WT1298/Var1298 heterozygote Variante
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	
2	QS	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	WT677/Var677 WT1298/Var1298 heterozygote Variante
	EZ1	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	
	QA	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	
3	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	WT677/WT677 WT1298/Var1298 heterozygote Variante
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	
4	QS	Homozygous variant var677/var677	Homozygoter WT WT1298/WT1298	Var677/Var677 WT1298/WT1298 homozygote Variante
	EZ1	Homozygous variant var677/var677	Homozygoter WT WT1298/WT1298	
	QA	Homozygous variant var677/var677	Homozygoter WT WT1298/WT1298	

Donor	Method	nt 677	nt 1298	Genotype result
5	QS	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	WT677/Var677 WT1298/Var1298 heterozygote Variante
	EZ1	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	
	QA	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	
6	QS	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	WT677/Var677 WT1298/Var1298 heterozygote Variante
	EZ1	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	
	QA	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	
7	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygoter WT WT1298/WT1298	WT677/WT677 WT1298/WT1298 homozygoter Wildtyp
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygoter WT WT1298/WT1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygoter WT WT1298/WT1298	
8	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygoter WT WT1298/WT1298	WT677/WT677 WT1298/WT1298 homozygoter Wildtyp
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygoter WT WT1298/WT1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygoter WT WT1298/WT1298	
9	QS	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	WT677/Var677 WT1298/Var1298 heterozygote Variante
	EZ1	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	
	QA	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygote Variante WT1298/Var1298	
10	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygoter WT WT1298/WT1298	WT677/WT677 WT1298/WT1298 homozygoter Wildtyp
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygoter WT WT1298/WT1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygoter WT WT1298/WT1298	

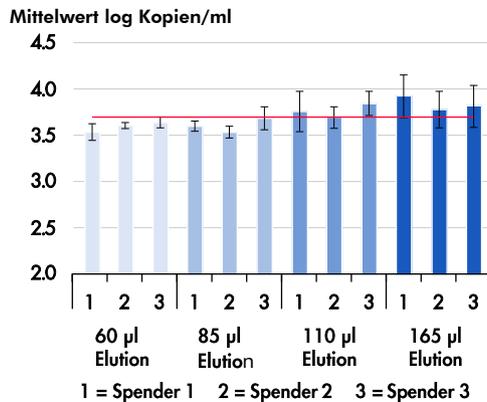
Die genetische Varianz des Methylentetrahydrofolat-Reduktase-(MTHFR-)Gens an zwei Nukleotid-Positionen (Nt. 677 und Nt. 1298) wurde durch Schmelzkurven-analyse mithilfe des LightCycler® Thermocyclers analysiert. Vollblut von zehn gesunden Spendern wurde in BD-Röhrchen (mit K2E-EDTA als Antikoagulans) entnommen. Bei allen Methoden wurden ein Ausgangs-Probenvolumen von 200 µl und ein Elutionsvolumen von 200 µl verwendet. QS = QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit und „Blood 200 DSP“-Protokoll; EZ1 = DNA-Präparation mit dem EZ1 Advanced XL und EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA = manuelle DNA-Präparation mithilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kits. WT = Wildtyp-Allel an der jeweiligen Position des MTHFR-Gens; Var = Allel-Variante an der jeweiligen Position des MTHFR-Gens.

## Virushaltiges Blut

Die Leistungscharakteristik für Applikationen mit virushaltigem Blut wurde mit Proben von Blutspendern mit einer Leukozytenzahl zwischen 4,0 und 11,0 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml untersucht.

## Wiederfindung viraler DNA

Vollblut von drei gesunden Spendern wurde in BD-Röhrchen (mit K2E-EDTA als Antikoagulans) entnommen und mit einem CMV-Standard angeimpft (Titer: 3,7 log Kopien/ml). Die virale DNA wurde aus 7 Wiederholproben unter Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini Kits nach dem „Virus Blood 200 DSP“-Protokoll mit 4 verschiedenen Elutionsvolumina isoliert (siehe Abb. 7).

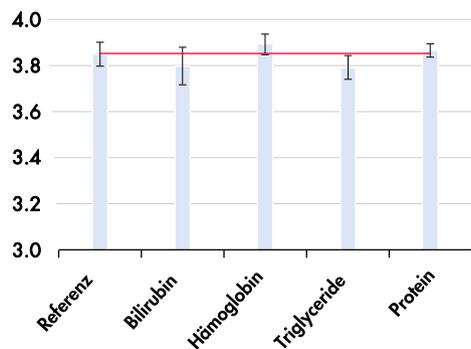


**Abbildung 7. Vergleich der Quantifizierung viraler DNA bei verschiedenen Elutionsvolumina.** Die für jede Spender-Probe und bei den verschiedenen Elutionsvolumina (60 µl, 85 µl, 110 µl und 165 µl) erhaltenen Eluate wurden mit dem *artus* CMV RG PCR Kit analysiert. Die rote Linie repräsentiert den Target-Titer und die Säulen geben den Mittelwert in „log Kopien pro Milliliter“ mit Standardabweichung wieder.

## PCR-Inhibitoren

Der Einfluss hemmender Substanzen, die im Vollblut vorhanden sein können, auf die Leistungsfähigkeit des „Virus Blood 200 DSP“-Protokolls wurde durch Zugabe folgender Substanzen getestet: Für Hämoglobin (200 g/l) und Protein (120/l) wurden die in der jeweiligen Blutprobe vorhandenen Konzentrationen bestimmt und dann zusätzliches Hämoglobin bzw. Protein hinzugegeben, um die angegebenen Konzentrationen, 200 g/l bzw. 120 g/l, einzustellen. Im Falle von Bilirubin (200 mg/l) und Triglyceriden (30 g/l) wurde die Gesamtmenge der Substanz jeweils zu den Proben hinzugegeben, um die genannten Konzentrationen einzustellen.

Mittelwert log Kopien/ml



**Abbildung 8. Test auf inhibitorische Substanzen.** Vollblut eines gesunden Spenders wurde in BD-Röhrchen (mit K2E-EDTA als Antikoagulans) entnommen und mit einem CMV-Standard angeimpft (Titer: 4,0 log Kopien/ml). Aus fünf Proben wurde nach Zugabe eines potenziellen PCR-Inhibitors die virale DNA jeweils in Vierfach-Bestimmung mithilfe des QIAAsymphony DSP DNA Mini Kits nach dem „DSP Virus Blood 200“-Protokoll mit einem Elutionsvolumen von 165 µl isoliert. Die Eluate wurden dann unter Verwendung des *artus* CMV RG PCR Kits analysiert. Die rote Linie repräsentiert den bestimmten Titer der Referenzproben, die nicht mit einer inhibitorischen Substanz versetzt worden waren, und die Säulen geben den Mittelwert in „log Kopien pro Milliliter“ mit Standardabweichung wieder.

## Sensitivität

Untersuchungen zur Trefferquote wurden mit einer Verdünnungsreihe eines vorquantifizierten CMV-Standards der WHO in CMV-negativem humanem Vollblut durchgeführt. Bei Proben ab einer Viruslast von 90 IU CMV pro Milliliter wurde eine Nachweisquote von 100 % erhalten.

Tabelle 8. Sensitivität der QIAAsymphony DSP Virus-Blut-Applikation

CMV (IU/ml)	Replicates	Hits	Hit %
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

Vollblut eines gesunden CMV-negativen Spenders wurde in BD-Röhrchen (mit K2E-EDTA als Antikoagulans) entnommen und mit einem CMV-Standard der WHO in verschiedenen Titern angeimpft. Die virale DNA wurde mithilfe des QIAAsymphony DSP DNA Mini Kits nach dem „DSP Virus Blood 200“-Protokolls mit einem Elutionsvolumen von 60 µl isoliert. Die Eluate wurden dann unter Verwendung des *artus* CMV RG PCR Kits analysiert.

---

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. QIAGEN Kit- und Geräte-Handbücher stehen unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) zur Verfügung oder können Sie vom QIAGEN Technischen Service oder dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter oder Distributor anfordern.

Warenzeichen/Markennamen: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAasymphony®, artus®, EZ1®, theascreen® (QIAGEN Gruppe); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG und Co.); BD™, Vacutainer®, (Becton Dickinson and Company); LightCycler® (Roche Gruppe). Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die in diesem Dokument verwendeten Markennamen oder Warenzeichen ungeschützt sind, auch wenn sie nicht als Markenname oder Warenzeichen gekennzeichnet sind. 08/2015 HB-0977-D01-004  
© 2012 -2015 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

