

Navodila za uporabo (Značilnosti delovanja) za komplet QIAamp[®] DSP DNA Blood Mini Kit

Različica 3



Za diagnostično uporabo in vitro.
Za uporabo s kompletom QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit



61104



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Nemčija

R1

Značilnosti delovanja, ki so dostopne elektronsko, lahko najdete na zavihku na strani z izdelki na spletnem mestu www.qiagen.com.

Splošni uvod

Komplet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit uporablja tehnologijo membrane na osnovi silicijevega dioksida (tehnologijo QIAamp) za izolacijo in prečiščevanje genomske DNK iz bioloških vzorcev.

Postopki QIAamp DSP DNA Blood Mini, ki so namenjeni sočasni obdelavi več vzorcev krvi, dajo prečiščeno DNK, pripravljeno za uporabo. Postopki so primerni za uporabo s svežo ali zamrznjeno polno krvjo in krvjo, ki je bila obdelana s citratom ali EDTA.

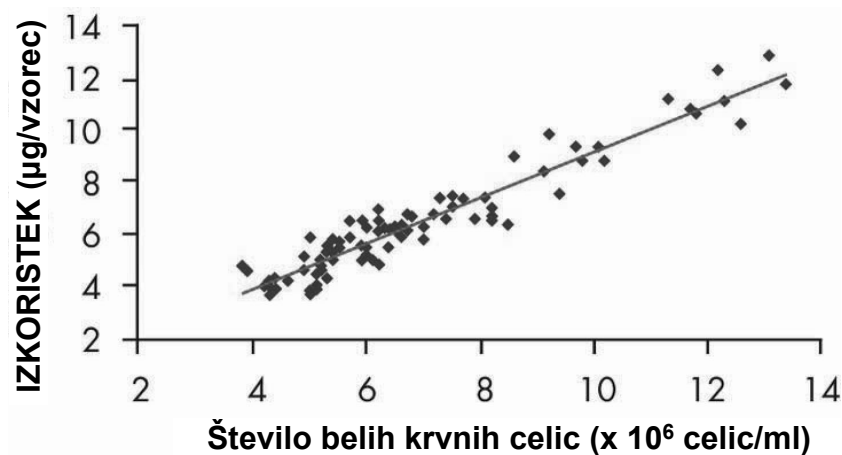
Preprosti postopki centrifugiranja in vakuumski postopki QIAamp DSP so primerni za sočasno obdelavo več vzorcev. Nekatere postopke vrtenja QIAamp je mogoče popolnoma avtomatizirati na QIAcube® Connect MDx za večjo standardizacijo in enostavnost uporabe. QIAcube Connect MDx izvaja avtomatizirano izolacijo in prečiščevanje nukleinskih kislin. Na en postopek lahko obdela do 12 vzorcev.

Značilnosti delovanja

Opomba: Značilnosti delovanja so zelo odvisne od različnih dejavnikov in povezane s specifičnimi zaključnimi postopki. Značilnosti delovanja so bile določene za QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit v povezavi z vzorčnimi zaključnimi postopki. Vendar se metode za izolacijo nukleinskih kislin iz biološkega vzorca uporabljajo kot začetne za več zaključnih postopkov in za vsak tak potek dela je treba v okviru razvoja zaključnih postopkov določiti parametre delovanja, kot so parametri navzkrižnega onesnaženja ali testna natančnost. Zato je uporabnik dolžan ovrednotiti celotni potek dela, da ugotovi primerne parametre delovanja.

Osnovno delovanje in združljivost z različnimi zaključnimi postopki

Osnovno delovanje vakuumskega postopka QIAamp DSP DNA Blood Mini je bilo določeno za kri zdravih darovalcev s številom belih krvnih celic od $3,8 \times 10^6$ do $1,34 \times 10^7$ celic/ml (glejte sliko 1).



Slika 1. Opaženi izkoristek DNK z uporabo vakuumskega postopka QIAamp DSP DNA Blood Mini z 200 μl volumna elucije. Določeno je bilo število belih krvnih celic zdravih darovalcev, ki je bilo v razponu od $3,8 \times 10^6$ do $1,34 \times 10^7$ celic/ml. DNK je bila prečiščena iz vzorcev krvi z uporabo vakuumskega postopka QIAamp DSP DNA Blood Mini z 200 μl volumna elucije. Obdelanih je bilo sedeminosemdeset trikratnih vzorcev.

Količina prečiščene DNK v postopkih QIAamp DSP DNA Blood Mini je odvisna od vsebnosti belih krvnih celic v vsakem vzorcu krvi. S postopkom centrifugiranja ali z vakuumskim postopkom genomsko DNK prečistimo iz 200 μl vzorcev krvi zdravih darovalcev. Za zbiranje vzorcev krvi za postopke QIAamp DSP DNA Blood Mini lahko uporabimo različne primarne epruvete in antikoagulantne (preglednica 1).

Preglednica 1. Povprečni relativni izkoristki DNK iz vzorcev krvi, odvzetih z uporabo različnih primarnih epruvet in antikoagulantov

Primarna epruveta	Proizvajalec	Kat. št.	Nazivni volumen	Povprečni izkoristek*
BD™ Vacutainer® 9NC	BD	366007	9 ml	6,4 μg
BD Vacutainer K3E	BD	36847	10 ml	6,6 μg
BD Vacutainer K2E	BD	367864	6 ml	6,4 μg
S-Monovette® EDTA	Sarstedt®	02.1066.001	9 ml	6,5 μg
S-Monovette CPDA1	Sarstedt	01.1610.001	8,5 ml	6,3 μg
Vacurette® K3E	Greiner Bio-One®	455036	9 ml	6,5 μg
Vacurette 9NC	Greiner Bio-One	454382	2 ml	6,3 μg

Genomsko DNK smo prečistili iz 200 μl vzorcev krvi zdravih darovalcev (od $4,0$ do $9,0 \times 10^6$ celic/ml).

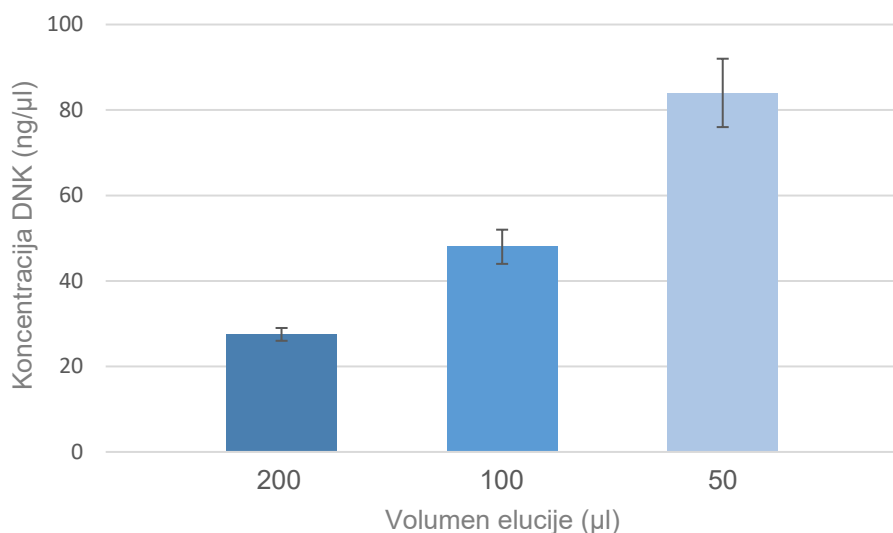
* Za vsako primarno epruveto se povprečni izkoristek določi iz 11 trikratnih vzorcev.

Eluirana genomska DNK je pripravljena za uporabo v različnih zaključnih testih.

Razpon začetnega vzorca/končnega eluata in čistost DNK

Za izolacijo genske DNK iz 200 μ l polne krvi je treba izbrati različne volumne elucije. Pri ročnem postopku je razpon elucije od 50 do 200 μ l. Pri popolnoma avtomatiziranem poteku dela pri vrtenju sta možna volumna elucije 100 in 200 μ l, pri delno avtomatiziranem poteku dela pri vrtenju (po ročni lizi) so možni volumni elucije 100–200 μ l (v korakih po 10 μ l). Z elucijo v manjšem volumnu se poveča končna koncentracija DNK v eluatu, a se skupni izkoristek DNK rahlo zmanjša. Priporočamo uporabo volumna elucije, ki je primeren za predvideni zaključni postopek.

Ocenjen je učinek različnih volumnov elucije na skupno koncentracijo DNK. Na sliki 2 je prikazano povečanje koncentracije DNK v eluatih pri zmanjšanju volumna elucije.



Slika 2. Koncentracija DNK, pridobljena po izolaciji DNK iz polne krvi s kompletom QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit z različnimi volumni elucije. Vsaka vrstica na grafu predstavlja rezultate 32 ponovitev (povprečje \pm standardni odklon).

Poleg tega je bilo kot kazalnik čistosti DNK izmerjeno razmerje med absorbanco pri 260 in 280 nm za različne testirane volumne elucije. Med različnimi volumni elucije ni bilo opaženih nobenih razlik in v splošnem je povprečno razmerje kazalo na majhno onesnaženje s proteini.

Natančnost

Pri avtomatizirani ekstrakciji humane genske DNK iz polne krvi s kompletom QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit na QIAcube Connect MDx so bili določeni koeficienti variacije (Coefficient of Variation, CV). Skupni izkoristek DNK je bil določen z meritvijo OD.

Določeni sta bili ponovljivost (medtestna variabilnost v enem postopku čiščenja) in vmesna natančnost (medtestna variabilnost med različnimi postopki čiščenja z različnimi upravljavci, na različnih instrumentih in ob različnih dneh). Podatki o natančnosti so prikazani v preglednici 2.

Preglednica 2. Analiza ocen natančnosti

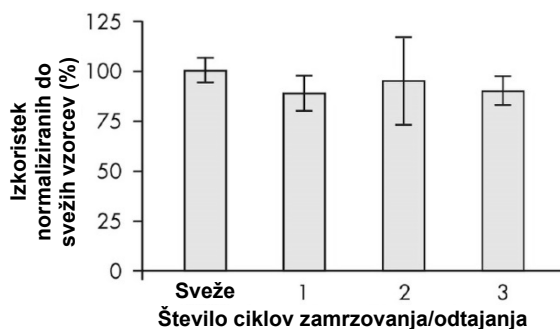
Natančnost	CV (%)
Vmesna natančnost	1,65
Ponovljivost	6,09
Skupna natančnost	6,24

Pri ročnem vakuumskem postopku so bile za oceno vmesne natančnosti, ponovljivosti in zmožnosti reprodukcije določene in ovrednotene srednje vrednosti izkoristkov in koeficientov variacije (Coefficient of Variation, CV). Poleg tega sta bili analizirani integriteta DNK in delovanje pri testu real-time PCR.

Stabilnost vzorca

Opomba: Stabilnost vzorca je zelo odvisna od različnih dejavnikov in povezana s specifičnimi zaključnimi postopki. Ovrednotena je z vzorčnimi zaključnimi postopki. Dolžnost uporabnika je, da si za ugotavljanje pravih pogojev shranjevanja ogleda navodila za uporabo pri specifičnem zaključnem postopku, ki se uporablja v njegovem laboratoriju, in/ali potrdi celoten potek dela.

Ugotovljeni so bili učinki zmrzovanja in odtajanja vzorcev krvi, obdelanih z EDTA, pri prečiščevanju DNK z uporabo kompleta QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Opazili niso nobenega znatnega zmanjšanja izkoristka (glejte sliko 3) ali delovanja pri zaključnih postopkih.



Slika 3. Učinki zamrzovanja in odtajanja vzorcev krvi. Kri, obdelana z EDTA, je bila do 3-krat zamrznjena in odmrznjena, nato pa podvržena prečiščevanju DNK s pomočjo kompleta QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Izračunani izkoristki DNK se normalizirajo na izkoristke iz svežega vzorca (100 %). Vsaka vrstica na grafu predstavlja rezultate 32 ponovitev (povprečje ± standardni odklon).

Stabilnost eluata

Opomba: Stabilnost eluata je zelo odvisna od različnih dejavnikov in povezana s specifičnimi zaključnimi postopki. Ovrednotena je bila za komplet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit v povezavi z vzorčnimi zaključnimi postopki. Dolžnost uporabnika je, da si za ugotavljanje pravih pogojev shranjevanja oglada navodila za uporabo pri specifičnem zaključnem postopku, ki se uporablja v njegovem laboratoriju, in/ali potrdi celoten potek dela.

Po ekstrakciji nukleinske kisline iz človeške krvi s spektrofotometrijo in pri testu real-time PCR je bila ovrednotena stabilnost eluata za komplet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Eluirana DNK je lahko shranjena pri temperaturi 2–8 °C do 4 tednov. Pri dolgotrajnem shranjevanju priporočamo temperaturo –20 °C.

Moteče snovi

Različne potencialne eksogene in endogene moteče snovi, ki so bile prisotne v pacientovi polni krvi, so bile nabrizgane v vzorce krvi, da bi preizkusili njihov vpliv na vzorčne zaključne postopke po izolaciji gDNA s kompletom QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Ovrednotene so bile pogoste pomembne potencialne moteče snovi za hemolizo (humani hemoglobin), lipemijo (trigliceridi) in zlatenico (nekonjugirani bilirubin). Poleg tega je bil ocenjen moteči učinek koncentracije antikoagulantov K2-EDTA, K3-EDTA in Na2-EDTA, ki je bila trikrat višja od tiste, ki je bila že prisotna v epruveti za odvzem. Pri teh potencialnih motečih snoveh in približno 20 dodatnih potencialnih motečih snoveh, kot so običajno uporabljena zdravila, na primer za zdravljenje raka, pri katerih je zato zelo verjetno, da bodo v vzorcih pacientov odkrita, bi bil opažen noben pomemben negativen učinek.

Opomba: Testiranje je bilo opravljeno z vzorčnimi zaključnimi postopki za oceno kakovosti ekstrahiranih nukleinskih kislin. Vendar so pri različnih zaključnih postopkih lahko različne zahteve glede čistosti (npr. odsotnost ali koncentracija potencialno motečih snovi), zato je treba v okviru razvoja zaključnih postopkov tudi identificirati in testirati moteče snovi in ustrezne koncentracije za katerikoli potek dela, v katerega je vključen komplet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Vse potencialne moteče snovi (npr. zdravila) in ustrezne koncentracije so zelo specifične za zaključni postopek in med preverjanjem takšnega zaključnega postopka s kompletom QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit je treba preučiti možna prejšnja zdravljenja pacienta.





Opomba: V skladu s standardom ISO 20186-2:2019(E) lahko heparin iz epruвет za odvzem krvi lahko vpliva na čistost izoliranih nukleinskih kislin, potencialni prenos v eluate pa lahko v nekaterih zaključnih postopkih povzroči zaviranje. Zato priporočamo uporabo krvnih vzorcev, obdelanih z EDTA ali citratom kot antikoagulantom za pripravo plazme.

Navzkrižno onesnaženje

Na QIAcube Connect MDx je bilo analizirano tveganje navzkrižnega onesnaženja za samodejno prečiščevanje nukleinske kisline z izvedbo petih 12 vzorčnih serij z izmeničnimi serijami šahovnice (izmeničnimi pozitivnimi in negativnimi vzorci) z vzorčnim potekom dela QIAamp (QIAamp DSP Virus Spin skupaj z vzorci plazme in seruma z 1,00E+07 kopij/ml virusa DNK). Z naknadno analizo eluatov pri testu real-time PCR je bilo ovrednoteno potencialno onesnaženje negativnih vzorcev med postopki ekstrakcije. Pri prenosu z enega na drugi vzorec ali iz enega v drug test ni bilo zaznano nobeno navzkrižno onesnaženje.

Simboli

V tem dokumentu so prikazani naslednji simboli. Celoten seznam simbolov, uporabljen v navodilih za uporabo ali na embalaži in oznakah si oglejte v priročniku.

Simbol	Oprelitev simbola
	Ta izdelek izpolnjuje zahteve evropske direktive 2017/746 za diagnostične medicinske pripomočke in vitro.
	Diagnostični medicinski pripomoček in vitro
	Kataloška številka
Rn	R pomeni revizijo navodil za uporabo, n pa številko revizije
	Proizvajalec

Zgodovina revizij

Revizija

Opis

R1, junij 2022

Različica 3, revizija 1

- Posodobitev na različico 3 za skladnost z IVDR
- Prenos in posodobitev poglavja Značilnosti delovanja iz priročnika za komplet v ta dokument:
 - prenos razdelka Izkoristek prečiščene DNK in razdelka Učinkovitost v zaključnih testih v razdelek Osnovno delovanje in združljivost z različnimi zaključnimi postopki;
 - dodajanje razdelka Razpon začetnega vzorca/končnega eluata in čistost DNK;
 - dodajanje razdelka Natančnost;
 - posodobitev razdelka Stabilnost eluata;
 - dodajanje razdelka Stabilnost vzorca;
 - dodajanje razdelka Moteče snovi;
 - dodajanje razdelka Navzkrižno onesnaženje;
 - dodajanje razdelka Simboli;
 - dodajanje razdelka Zgodovina revizij.

Posodobljene informacije o licenciranju in zavrnitve odgovornosti za izdelek so na voljo v priročniku ali navodilih za uporabo zadevnega kompleta znamke QIAGEN. Priročniki in navodila za uporabo kompletov znamke QIAGEN so na voljo na spletni strani www.qiagen.com, lahko pa jih tudi naročite pri oddelku za tehnične storitve družbe QIAGEN ali lokalnem distributerju.

Blagovne znamke: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, Pyrosequencing® (Skupina QIAGEN); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); Vacuette® (Greiner Bio-One GmbH). Registrirana imena, blagovne znamke itd., ki so uporabljeni v tem dokumentu, ne smejo veljati za nezaščitene z zakonom, tudi če niso izrecno označeni kot takšni.
HB-3030-D01-001 © 2022 QIAGEN, vse pravice pridržane.

