



Czerwiec 2022 r.

QIAamp[®] DSP DNA Blood Mini Kit — Instrukcja użycia (Parametry skuteczności)

Wersja 3



Do diagnostyki in vitro

Do użytku z zestawem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit



61104



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Niemcy

R1

Parametry skuteczności są dostępne w wersji elektronicznej i można je znaleźć na stronie produktu pod adresem www.qiagen.com, na karcie Resource (Materiały Źródłowe).

Informacje ogólne

Zestaw QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit wykorzystuje technologię membrany krzemionkowej (technologia QIAamp) do izolacji i oczyszczania genomowego DNA z próbek biologicznych.

Procedury QIAamp DSP DNA Blood Mini przeznaczone do jednoczesnego przetwarzania wielu próbek krwi umożliwiają otrzymanie oczyszczonego DNA gotowego do użycia. Procedury te są odpowiednie do stosowania ze świeżymi lub mrożonymi próbkami krwi pełnej oraz krwi poddanej działaniu cytrynianu lub EDTA.

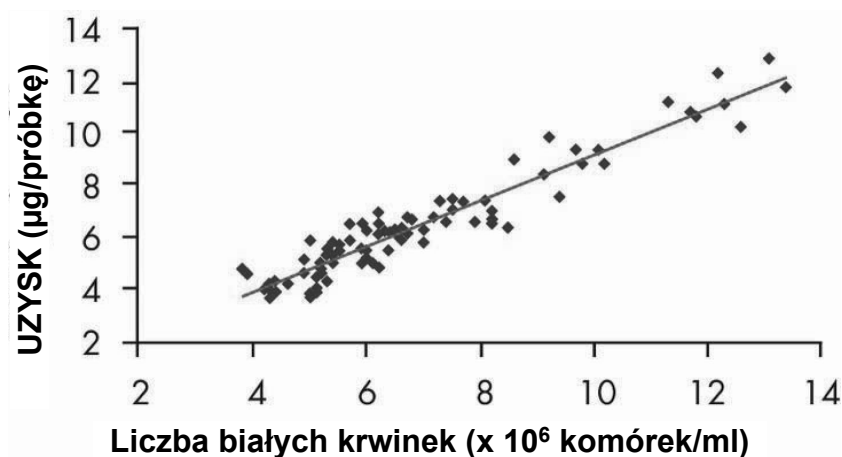
Proste procedury wirówkowe i próżniowe QIAamp DSP są odpowiednie do przetwarzania wielu próbek jednocześnie. Niektóre z procedur wirówkowych QIAamp można wykonywać w aparacie QIAcube® Connect MDx w sposób w pełni zautomatyzowany — zapewnia to lepszą standaryzację procesu oraz ułatwia obsługę produktu. Etapy izolacji i oczyszczania kwasów nukleinowych są przeprowadzane w aparacie QIAcube Connect MDx w sposób zautomatyzowany. Aparat umożliwia przetwarzanie do 12 próbek w jednym cyklu.

Parametry skuteczności

Uwaga: Parametry skuteczności w dużym stopniu zależą od różnych czynników i są powiązane z konkretną dalszą procedurą analityczną. Parametry skuteczności zostały ustalone dla zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit używanego w połączeniu ze standardowymi dalszymi procedurami analitycznymi. Metody izolacji kwasów nukleinowych z próbek biologicznych stanowią jednak etap początkowy dla wielu dalszych procedur analitycznych, dlatego parametry skuteczności, takie jak np. występowanie zanieczyszczenia krzyżowego lub precyzja testu, muszą zostać określone dla całego przepływu pracy (z uwzględnieniem wszystkich procedur) jako część procesu opracowywania konkretnej dalszej procedury analitycznej. Z tego względu użytkownik jest odpowiedzialny za walidację całego przepływu pracy w celu ustalenia odpowiednich parametrów do oceny skuteczności.

Skuteczność podstawowa i zgodność z różnymi dalszymi procedurami analitycznymi

Skuteczność podstawowa procedury próżniowej QIAamp DSP DNA Blood Mini została określona na podstawie próbek krwi pobranych od zdrowych dawców, w których liczba białych krwinek wynosiła od $3,8 \times 10^6$ do $1,34 \times 10^7$ komórek/ml (patrz Ryc. 1).



Ryc. 1. Obserwowana wartość uzysku w przypadku procedury próżniowej QIAamp DSP DNA Blood Mini przy objętości elucji równej 200 µl. Liczba białych krwinek we krwi zdrowych dawców została określona i wynosiła od $3,8 \times 10^6$ do $1,34 \times 10^7$ komórek/ml. DNA oczyszczono z próbek krwi za pomocą procedury próżniowej QIAamp DSP DNA Blood Mini przy objętości elucji równej 200 µl. Przetworzono osiemdziesiąt siedem próbek w trzech powtórzeniach.

Ilość DNA oczyszczonego w procedurach QIAamp DSP DNA Blood Mini zależy od zawartości białych krwinek w każdej próbce krwi. Genomowy DNA jest oczyszczany z pobranych od zdrowych dawców próbek krwi o objętości 200 µl za pomocą procedury wirówkowej lub próżniowej. Do pobrania próbek krwi do procedur QIAamp DSP DNA Blood Mini można użyć wielu różnych probówek pierwotnych i antykoagulantów (Tabela 1).

Tabela 1. Średnie względne uzyski DNA z próbek krwi pobranych przy zastosowaniu różnych probówek pierwotnych i antykoagulantów

Probówka pierwotna	Producent	Nr kat.	Objętość nominalna	Średni uzysk*
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
Vacuette® K3E	Greiner Bio-One®	455036	9 ml	6,5 µg
Vacuette 9NC	Greiner Bio-One	454382	2 ml	6,3 µg

Genomowy DNA oczyszczono z pobranych od zdrowych dawców próbek krwi o objętości 200 µl (od 4,0 do 9,0 x 10⁶ komórek/ml).

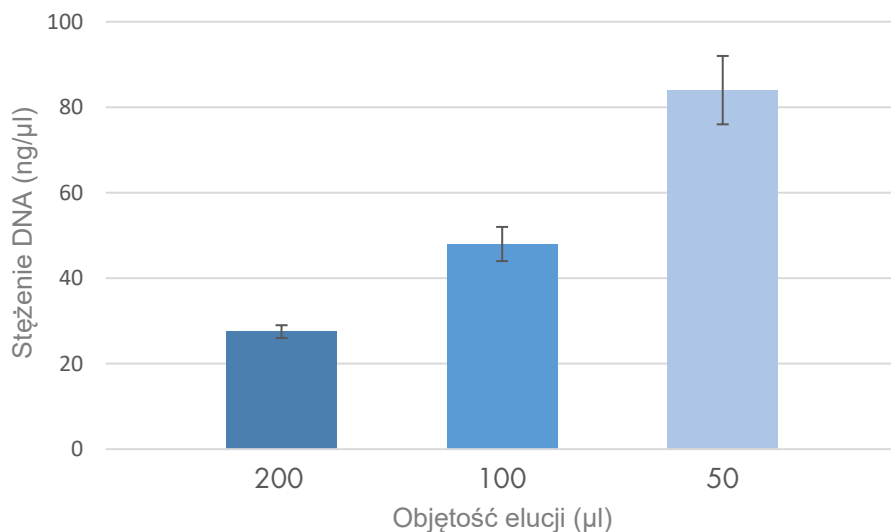
* Średni uzysk dla każdej probówki pierwotnej określono na podstawie 11 próbek przebadanych w trzech powtórzeniach.

Genomowy DNA po elucji jest gotowy do użycia w różnych dalszych oznaczeniach.

Zakres objętości wejściowych próbek i objętości wyjściowych eluatów oraz czystość DNA

W celu wyizolowania genomowego DNA z próbek krwi pełnej o objętości 200 µl można wybrać różne objętości elucji. W przypadku procedury ręcznej objętości elucji wynoszą od 50 do 200 µl. W przypadku w pełni zautomatyzowanej procedury wirówkowej dostępne objętości elucji to 100 i 200 µl, natomiast dla częściowo zautomatyzowanej procedury wirówkowej (wykonywanej po ręcznym przeprowadzeniu lizy) dostępne objętości elucji wynoszą 100–200 µl (przyrosty co 10 µl). Elucja w mniejszych objętościach powoduje zwiększenie końcowego stężenia DNA w eluacie, ale nieznacznie obniża wartość łącznego uzysku DNA. Zalecane jest stosowanie objętości elucji odpowiedniej do zaplanowanych dalszych procedur analitycznych.

Oceniono wpływ różnych objętości elucji na łączne stężenie DNA. Ryc. 2 przedstawia wzrost stężenia DNA w eluatach w miarę zmniejszania objętości elucji.



Ryc. 2. Wartości stężeń DNA uzyskane po izolacji DNA z próbek krwi pełnej przy użyciu zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit i różnych objętości elucji. Każdy słupek na wykresie przedstawia wyniki otrzymane z 32 powtórzeń (średnia ± odchylenie standardowe).

Dodatkowo dla różnych badanych objętości elucji zmierzono stosunek absorbancji przy długościach fali 260 i 280 nm w celu określenia czystości DNA. Nie odnotowano różnic dla różnych objętości elucji, a wartość średnia stosunku wskazywała na niskie zanieczyszczenie białkiem.

Precyzja

Współczynniki zmienności (Coefficient of Variation, CV) zostały określone dla ludzkiego genomowego DNA wyizolowanego w ramach procedury zautomatyzowanej z próbek krwi pełnej przy użyciu zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit w aparacie QIAcube Connect MDx. Całkowity uzysk DNA został określony poprzez pomiar OD.

Określono powtarzalność (zmienność wyników jednego testu w ramach jednego cyklu oczyszczania) oraz precyzję pośrednią (zmienność wyników między testami w kontekście różnych cykli oczyszczania przeprowadzanych przez różnych operatorów, na różnych aparatach i w różnych dniach). Dane dotyczące precyzji przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Analiza oszacowań wartości precyzji

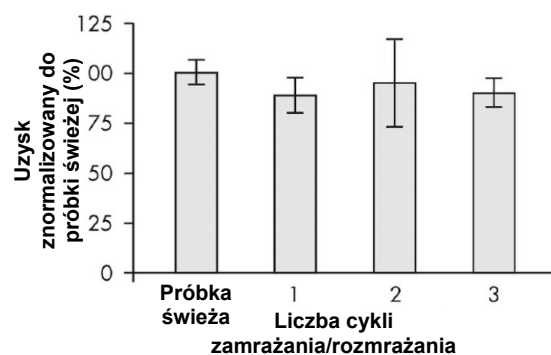
Precyzja	CV (%)
Precyzja pośrednia	1,65
Powtarzalność	6,09
Precyzja całkowita	6,24

Średnie wartości uzysków i CV z ręcznej procedury próżniowej zostały przeanalizowane w celu oceny precyzji pośredniej, powtarzalności i odtwarzalności. Dodatkowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR przeanalizowano integralność i wydajność DNA.

Stabilność próbek

Uwaga: Stabilność próbki w dużym stopniu zależy od różnych czynników i odnosi się do konkretnej dalszej procedury analitycznej. Została określona dla standardowych dalszych procedur analitycznych. Obowiązkiem użytkownika jest zapoznanie się z instrukcjami wykonywania konkretnej dalszej procedury analitycznej przeprowadzanej w jego laboratorium i/lub zwalidowanie całego przebiegu pracy (z uwzględnieniem wszystkich procedur) w celu ustalenia odpowiednich warunków przechowywania.

Oceniono wpływ zamrażania i rozmrażania próbek krwi poddanych działaniu EDTA na oczyszczanie DNA przy użyciu zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Nie odnotowano istotnego obniżenia wartości uzysku (patrz Ryc. 3) lub wydajności w dalszych oznaczeniach.



Ryc. 3. Wpływ zamrażania i rozmrażania próbek krwi. Próbki krwi poddane działaniu EDTA zamrażano i rozmrażano do 3 razy, a następnie wykonywano oczyszczanie DNA za pomocą zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Obliczone uzyski DNA znormalizowano do uzysku ze świeżej próbki (100%). Każdy słupek na wykresie przedstawia wyniki otrzymane z 32 powtórzeń (średnia \pm odchylenie standardowe).

Stabilność eluatu

Uwaga: Stabilność eluatu w dużym stopniu zależy od różnych czynników i odnosi się do konkretnej dalszej procedury analitycznej. Została ona oceniona dla zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit używanego w połączeniu ze standardowymi dalszymi procedurami analitycznymi. Obowiązkiem użytkownika jest zapoznanie się z instrukcjami wykonywania konkretnej dalszej procedury analitycznej przeprowadzanej w jego laboratorium i/lub zwalidowanie całego przebiegu pracy (z uwzględnieniem wszystkich procedur) w celu ustalenia odpowiednich warunków przechowywania.

Stabilność eluatu dla zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit po izolacji kwasu nukleinowego z próbki krwi ludzkiej została oceniona spektrofotometrycznie oraz przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR. Eluowany DNA można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 4 tygodnie. W przypadku przechowywania długoterminowego zalecana jest temperatura –20°C.

Substancje zakłócające

Różne potencjalne egzogenne i endogenne substancje zakłócające mogące występować w próbkach krwi pełnej pacjentów zostały dodane do próbek krwi w celu sprawdzenia ich wpływu na standardowe dalsze oznaczenia wykonywane po izolacji gDNA przy użyciu zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Ocenie poddano istotne potencjalne substancje zakłócające powszechnie występujące w przypadku hemolizy (ludzka hemoglobina), lipemii (trójglicerydy) i żółtaczk (bilirubina niezwiązana). Ponadto zbadano również zakłócający wpływ antykoagulantów, takich jak K₂-EDTA, K₃-EDTA i Na₂-EDTA, występujących w stężeniach trzykrotnie wyższych niż normalnie w próbkach do pobierania. Nie zaobserwowano żadnego znaczącego negatywnego wpływu ze strony tych potencjalnych substancji zakłócających oraz około 20 dodatkowych potencjalnych substancji zakłócających, takich jak leki zazwyczaj stosowane np. w leczeniu raka, które mogą występować w próbkach pacjentów.

Uwaga: Testy zostały przeprowadzone w ramach standardowych dalszych procedur analitycznych w celu oceny jakości wyizolowanych kwasów nukleinowych. Różne dalsze procedury analityczne mogą jednak być odmienne pod względem wymagań dotyczących czystości materiału (tj. braku lub stężenia potencjalnych substancji zakłócających), dlatego sposób identyfikacji i badania różnych substancji zakłócających i ich stężeń musi również zostać ustalony jako część procesu opracowywania konkretnych dalszych procedur analitycznych dla jakiegokolwiek przebiegu pracy uwzględniającego użycie zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Wszelkie potencjalne substancje zakłócające (np. leki) oraz ich stężenia są ściśle powiązane z konkretnymi dalszymi procedurami analitycznymi oraz możliwym wcześniejszym leczeniem zastosowanym w ramach opieki medycznej nad pacjentem, dlatego muszą zostać zbadane podczas weryfikacji konkretnych dalszych procedur analitycznych wykonywanych z użyciem zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.





Uwaga: Zgodnie z normą ISO 20186-2:2019(E) heparyna pochodząca z próbek do pobierania krwi może wpływać na czystość izolowanych kwasów nukleinowych, a w przypadku jej ewentualnego przeniesienia do eluatów może wykazywać właściwości inhibicyjne w dalszych procedurach analitycznych. Dlatego zalecane jest, aby w celu przygotowania próbek osocza używać próbek krwi, w przypadku których jako antykoagulant zastosowano EDTA lub cytrynian.

Zanieczyszczenie krzyżowe

Przeanalizowano ryzyko wystąpienia zanieczyszczenia krzyżowego podczas zautomatyzowanego oczyszczania kwasu nukleinowego w aparacie QIAcube Connect MDx. Na potrzeby badania wykonano pięć cykli, w których przetwarzano po 12 próbek. Próbki o różnym statusie były testowane w ramach jednej partii, w której układano je w układzie „szachownicy” (naprzemiennie ułożone próbki pozytywne i negatywne). Zastosowano standardową procedurę QIAamp (procedura QIAamp DSP Virus Spin, w której razem przetwarzano próbki osocza i surowicy o stężeniu DNA wirusa wynoszącym $1,00E+07$ kopii/ml). Ryzyko wystąpienia potencjalnego zanieczyszczenia negatywnych próbek podczas procesu izolacji zostało następnie ocenione poprzez wykonanie analizy uzyskanych eluatów przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR. Nie wykryto zanieczyszczenia krzyżowego spowodowanego przeniesieniem między próbkami oraz między cyklami przetwarzania.

Symbole

W niniejszym dokumencie używane są poniższe symbole. Pełna lista symboli zamieszczonych w instrukcji użycia oraz na opakowaniu i etykietach znajduje się w instrukcji obsługi.

Symbol	Definicja symbolu
	Ten produkt spełnia wymogi rozporządzenia europejskiego 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
Rn	R oznacza wydanie instrukcji użycia, a n oznacza numer wydania
	Producent

Historia zmian

Wydanie

Opis

R1, czerwiec 2022 r.

Wersja 3, wydanie 1

- W ramach wersji 3 zaktualizowano treść w celu zapewnienia zgodności z rozporządzeniem IVDR
- Informacje dotyczące parametrów skuteczności zostały zaktualizowane i przeniesione z instrukcji obsługi zestawu do niniejszego dokumentu:
 - Treść części „Uzysk oczyszczonego DNA” i „Skuteczność w dalszych oznaczeniach” została przeniesiona do części „Skuteczność podstawowa i zgodność z różnymi dalszymi procedurami analitycznymi”
 - Dodano część „Zakres objętości wejściowych próbek i objętości wyjściowych eluatów oraz czystość DNA”
 - Dodano część „Precyzja”
 - Zaktualizowano treść części „Stabilność eluatu”
 - Dodano część „Stabilność próbek”
 - Dodano część „Substancje zakłócające”
 - Dodano część „Zanieczyszczenie krzyżowe”
 - Dodano część „Symbole”
 - Dodano część „Historia zmian”

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów można znaleźć w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawów QIAGEN są dostępne pod adresem www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie technicznym lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); Vacuette® (Greiner Bio-One GmbH); Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały wyraźnie oznaczone jako zastrzeżone, nie należy uznawać za niechronione przepisami prawa.
HB-3030-D01-001 © 2022 QIAGEN. Wszelkie prawa zastrzeżone.

