

INSTRUKCJA TECHNICZNA

Zestaw Maxwell[®] CSC Blood DNA Kit

Instrukcja użytkowania produktu
AS1321

Przestroga: Z kartridżami należy obchodzić się ostrożnie; krawędzie zamknięcia kartridża mogą być ostre.

Zestaw Maxwell[®] CSC Blood DNA Kit

Dokumentacja techniczna jest dostępna na stronie internetowej pod adresem: www.promega.com/protocols/
 Na tej stronie internetowej można sprawdzić, czy używana wersja niniejszej instrukcji technicznej jest aktualna.
 W razie pytań dotyczących obsługi tego systemu prosimy o kontakt z działem Promega Technical Services pod adresem:
techserv@promega.com.

1. Opis	2
2. Elementy produktu, warunki przechowywania i objaśnienie symboli	3
3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu	5
4. Ograniczenia stosowania produktu	5
5. Przed rozpoczęciem	6
5.A. Przygotowanie próbek pełnej krwi	6
5.B. Przygotowanie kartridży Maxwell [®] CSC Blood DNA Cartridge	7
6. Przebieg pracy aparatu	9
7. Czynności po zakończeniu oczyszczania	11
8. Ocena wydajności analitycznej	12
8.A. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji DNA	12
8.B. Odtwarzalność	15
8.C. Substancje zakłócające (inhibicja)	16
8.D. Zanieczyszczenie krzyżowe	16
9. Ocena wydajności klinicznej	17
9.A. Zdolność amplifikacji DNA	17
9.B. Odtwarzalność	18
9.C. Zanieczyszczenie krzyżowe	18
10. Rozwiązywanie problemów	19
11. Źródło	20
12. Powiązane produkty	20
13. Podsumowanie zmian	20

Zestaw Maxwell® CSC Blood DNA Kit jest dostępny wyłącznie w niektórych krajach.

1. Opis

Zestaw Maxwell® CSC Blood DNA Kit^(a,b) jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z aparatami Maxwell® Instrument, które zostały przedstawione w Tabeli 1, w celu zapewnienia łatwej metody wydajnego i zautomatyzowanego oczyszczania genomowego DNA (gDNA) w próbkach krwi ludzkiej. Aparaty Maxwell® CSC Instrument są dostarczane ze wstępnie zaprogramowanymi metodami oczyszczania i przeznaczone do stosowania ze wstępnie napełnionymi kartridżami z odczynnikami oraz z dodatkowymi odczynnikami dostarczonymi w zestawie, co zwiększa wygodę i upraszcza stosowanie. Aparaty Maxwell® CSC Instrument mogą przetworzyć od jednej do maksymalnej dozwolonej liczby próbek w około 40 minut, a oczyszczone DNA nadaje się do bezpośredniego wykorzystania w różnych zastosowaniach na dalszych etapach, takich jak reakcja PCR.

Tabela 1. Kompatybilny z urządzeniami.

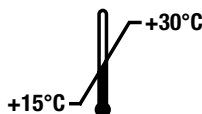
Urządzenie	Cat. #	Instrukcja techniczna
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Podstawy metody: Zestaw Maxwell® CSC Blood DNA Kit umożliwia oczyszczanie kwasu nukleinowego przy wykorzystaniu cząsteczek paramagnetycznych, co zapewnia ruchomą fazę stałą stwarzającą optymalne warunki do wychwytywania próbki, przemywania i oczyszczania gDNA. Aparaty Maxwell® CSC Instrument są urządzeniami przeprowadzającymi analizy w oparciu o cząsteczki magnetyczne, które umożliwiają skuteczne wiązanie gDNA z cząsteczkami paramagnetycznymi w pierwszym dołku wstępnie napełnionego kartridża i przenoszą próbkę przez dołki kartridża. Zastosowanie magnetycznego wychwytywania pozwala na uniknięcie często występujących problemów, takich jak zatkane końcówki lub częściowe przeniesienie odczynnika, które obniżają jakość procesów oczyszczania w innych powszechnie stosowanych zautomatyzowanych systemach.

2. Elementy produktu, warunki przechowywania i objaśnienie symboli

PRODUKT	ILOŚĆ	CAT.#
Zestaw Maxwell® CSC Blood DNA Kit	48 preparatów	AS1321

Do stosowania w diagnostyce in vitro. Wyłącznie do użytku przez specjalistów. Zawiera ilość wystarczającą do przeprowadzenia 48 zautomatyzowanych izolacji z próbek pełnej krwi o objętości 300 µl. Kartridże Maxwell® CSC Cartridges są przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku.



Zawartość zestawu:

- 2 × 1 ml roztworu proteiny K (PK)
- 20 ml buforu lizującego
- 48 kartridży Maxwell® CSC Blood Cartridges
- 50 tłoczków CSC/RSC
- 50 probówek do elucji (0,5 ml)
- 20 ml buforu do elucji

Warunki przechowywania: Zestaw Maxwell® CSC Blood DNA Kit należy przechowywać w temperaturze od +15°C do +30°C.

 **Informacje dotyczące bezpieczeństwa:** Kartridże zawierają etanol i izopropanol. Substancje te należy traktować jako łatwopalne, szkodliwe i drażniące. Bufor lizujący zawiera chlorowoderek guanidyny i mocznik. Substancje te należy traktować jako toksyczne, szkodliwe i drażniące. Więcej informacji na temat bezpieczeństwa znajduje się w karcie SDS.

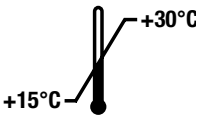
 Elementy zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit zaprojektowano do użytkowania z czynnikami potencjalnie zakaźnymi. Podczas pracy z czynnikami zakaźnymi należy nosić odpowiednie środki ochrony indywidualnej (np. rękawiczki i okulary ochronne). Należy przestrzegać obowiązujących w instytucji wytycznych dotyczących postępowania z czynnikami zakaźnymi używanymi z tym systemem oraz utylizacji takich czynników.

 **Przestroga:** Z kartridżami należy obchodzić się ostrożnie; krawędzie zamknięcia kartridża mogą być ostre.

Informacje dodatkowe: Elementy zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit zostały dopuszczone do łącznego stosowania na podstawie odpowiednich procedur kwalifikacyjnych i testów kontroli jakości. Nie zaleca się mieszania elementów zestawu z elementami zestawów różnych serii. Należy używać wyłącznie elementów dostarczonych w zestawie. Nie używać kartridży, jeśli zamknięcie na kartridżu było naruszone w momencie dostawy.

2. Elementy produktu, warunki przechowywania i objaśnienie symboli (ciąg dalszy)

Objaśnienie symboli

Symbol	Objaśnienie	Symbol	Objaśnienie
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Autoryzowany przedstawiciel
	Przechowywać w temperaturze od +15°C do +30°C.		Wytwórca
	Przestroga		Środek drażniący
	Zagrożenie dla zdrowia.		Zawiera ilość wystarczającą do przeprowadzenia „n” testów.
	Conformité Européenne		Ostrzeżenie. Zagrożenie biologiczne.
	Ostrzeżenie. Niebezpieczeństwo zmiążdżenia.		Numer katalogowy
	Numer serii		Nie używać ponownie.

3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu

Zestaw Maxwell® CSC Blood DNA Kit jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z aparatami Maxwell® CSC Instrument oraz metodą Maxwell® CSC Blood DNA Purification Method jako urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro (IVD) w celu automatycznego wyizolowania genomowego DNA z próbek ludzkiej pełnej krwi. Oczyszczony DNA nadaje się do stosowania w oznaczeniach wykonywanych na potrzeby diagnostyki in vitro opartych na amplifikacji.

Zestaw Maxwell® CSC Blood DNA Kit jest przeznaczony do stosowania w temperaturze 15°C i 30°C. Stosowanie zestawu poza tym zakresem temperatur może prowadzić do uzyskania nieprawidłowych wyników.

Z zestawem Maxwell® CSC Blood DNA Kit można stosować próbki pełnej krwi pobrane do próbek do pobierania krwi zawierających sól EDTA, heparynę lub środki przeciwkrzepliwe cytrynianu sodu. Poniższa tabela zawiera dopuszczalny okres przechowywania próbek w innych warunkach przed ich wykorzystaniem w zestawie Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Zestaw Maxwell® CSC Blood DNA Kit nie jest przeznaczony do stosowania z próbkami, które pobrano do innych rodzajów próbek do pobierania krwi lub które były przechowywane w warunkach innych niż określono w poniższej tabeli.

Temperatura przechowywania próbek	Okres przechowywania przed oczyszczeniem
15–30°C	Do 72 godz.
2–10°C	Do 7 dni
–80°C lub niższa	Bez ograniczeń

Zestaw Maxwell® CSC Blood DNA Kit jest przeznaczony wyłącznie do użytku przez specjalistów. Wyniki diagnostyczne uzyskane przy wykorzystaniu genomowego DNA oczyszczonego za pomocą tego systemu należy interpretować w połączeniu z innymi danymi klinicznymi lub laboratoryjnymi.

4. Ograniczenia stosowania produktu

Zestaw Maxwell® CSC Blood DNA Kit nie jest przeznaczony do stosowania z próbkami tkanek lub próbkami płynów ustrojowych innych niż pełna krew ludzka ani z próbkami zakrzepłej ludzkiej pełnej krwi.

Zestaw Maxwell® CSC Blood DNA Kit nie jest przeznaczony do stosowania z próbkami innymi niż ludzkie, w tym z próbkami bakteryjnymi i wirusowymi, ani do oczyszczania RNA.

Działanie zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit oceniono poprzez wyizolowanie DNA z próbek pełnej krwi o objętości 50–300 µl i liczbie krwinek białych (wbc) w zakresie od 4×10^6 do 10×10^6 wbc/ml.

Działanie zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit oceniono pod kątem zgodności z następującymi czynnikami potencjalnie hamującymi amplifikację genomowego DNA: hemem, alkoholem, immunoglobuliną IgG i guanidyną. Innych związków nie oceniono.

Użytkownik odpowiada za ustalenie charakterystyki roboczej wymaganej w dalszych zastosowaniach diagnostycznych. W przypadku dalszych zastosowań diagnostycznych należy zastosować odpowiednie środki kontrolne w zakresie używania genomowego DNA oczyszczonego za pomocą zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit.

5. Przed rozpoczęciem

Materiały zapewniane przez użytkownika

- mieszadło typu vortex
- pipetory i końcówki pipet do przenoszenia próbek do wstępnie napełnionych kartridży z odczynnikami
- probówki o pojemności 1,5–2,0 ml do inkubacji próbek (np. mikroprobówki o pojemności 1,5 ml, [Cat.# V1231])
- blok grzejny ustawiony na temperaturę 56°C
- **opcjonalne:** obrotowe mieszadło do probówek do płynnych próbek krwi

5.A. Przygotowanie próbek pełnej krwi

Wydajność przetwarzania próbek pełnej krwi

Łączny uzysk genomowego DNA z próbek pełnej krwi zależy od objętości próbki i liczby krwinek białych na ml. Każdy kartridż dostarczony w zestawie Maxwell® CSC Blood DNA Kit jest przeznaczony do oczyszczania genomowego DNA z próbek pełnej krwi o objętości 50–300 µl i liczbie krwinek białych w zakresie od 4×10^6 do 10×10^6 wbc/ml pełnej krwi (wartości dla zdrowej osoby dorosłej; 1). Zaleca się zliczenie krwinek białych w każdej próbce przed rozpoczęciem oczyszczania DNA w celu zapewnienia, że próbka mieści się w tym zakresie. W przypadku próbek poza tym zakresem uzyskane wyniki mogą nie być optymalne.

Uwaga: Zestaw przetestowano na próbkach ludzkiej pełnej krwi pobranych do probówek zawierających EDTA, cytrynian sodu lub heparynę. Działanie substancji chemicznych nie jest gwarantowane w przypadku innych rodzajów probówek do pobierania krwi. próbki krwi mogą być świeże (przechowywane w temperaturze 15–30°C przez maksymalnie 72 godz.), schłodzone (przechowywane w temperaturze 2–10°C przez maksymalnie siedem dni) lub zamrożone (przechowywane w temperaturze –80°C lub niższej) przed rozpoczęciem oczyszczania DNA. Zamrożone próbki należy rozmrozić przed rozpoczęciem przetwarzania. Wszystkie próbki krwi należy dokładnie wymieszać przed użyciem.

1. Mieszać wszystkie próbki krwi przez co najmniej 5 minut w temperaturze 15–30°C.
2. Przygotować i oznaczyć probówki do inkubacji, które zostaną umieszczone w bloku grzejnym ustawionym na temperaturę 56°C.
3. Dodać 30 µl roztworu proteiny K (PK) do każdej probówki do inkubacji.
4. Dodać płynną krew (od 50 µl do 300 µl) do każdej probówki do inkubacji. Należy uważać, aby nie przenieść zakrzepów (jeżeli są obecne) podczas przenoszenia krwi do probówki do inkubacji. System nie jest przeznaczony do stosowania z próbkami zakrzepłej krwi. Wymienić końcówki po przeniesieniu każdej próbki krwi w celu uniknięcia skażenia krzyżowego.
5. Dodać 300 µl buforu lizującego do każdej probówki do inkubacji. Wymienić końcówki po przeniesieniu każdej porcji buforu lizującego w celu uniknięcia skażenia krzyżowego.
6. Mieszać każdą probówkę z maksymalną szybkością przez 10 sekund na mieszadło typu vortex.

7. Inkubować każdą próbkę w bloku grzejnym (ustawionym na temperaturę 56°C) przez 20 minut. Podczas inkubacji przygotować kartridże w sposób opisany w rozdziale 5.B.
8. Po inkubacji sprawdzić każdy lizat. Po dodaniu proteiny K próbka zmieni kolor z czerwonego na zielonkawo-brązowy. Jeżeli próbka nie zmieni koloru po dodaniu proteiny K, oznacza to, że dodanie było nieskuteczne, co wpłynie na uzysk i czystość po oczyszczaniu DNA. Nie należy kontynuować przetwarzania próbki, jeżeli nie zostanie zaobserwowana żadna zmiana koloru pod koniec okresu inkubacji z proteiną K.
9. Przenieść każdą próbkę lisatu krwi z próbki do inkubacji do dołka nr 1 oddzielnego kartridża (dołek nr 1 to największy dołek w kartridżu). Wymienić końcówki po przeniesieniu każdej próbki w celu uniknięcia skażenia krzyżowego próbki.

5.B. Przygotowanie kartridży Maxwell® CSC Blood DNA Cartridge

1. Przed rozpoczęciem pracy z kartridżami, tłoczkami CSC/RSC i próbkami do elucji należy zmienić rękawiczki. Kartridże są ustawiane na tacach blatowych na zewnątrz aparatu, po czym tace blatowe, zawierające kartridże i próbki, są następnie przenoszone do aparatu w celu rozpoczęcia oczyszczania. Umieścić każdy kartridż na tacy blatowej tak, aby dołek nr 1 (największy dołek w kartridżu) znajdował się jak najdalej od próbek do elucji (Rysunek 2). Nacisnąć kartridż, aby zatrzasknął się w odpowiednim położeniu. Upewnić się, że oba końce kartridża znajdują się w całości na stojaku na kartridże. Ostrożnie zdjąć zamknięcie tak, aby usunąć całe zamknięcie z górnej części kartridża. Upewnić się, że cała taśma uszczelniająca i pozostałości kleju zostały usunięte z kartridża.



Przestroga: Z kartridżami należy się obchodzić ostrożnie. Krawędzie zamknięcia kartridża mogą być ostre.

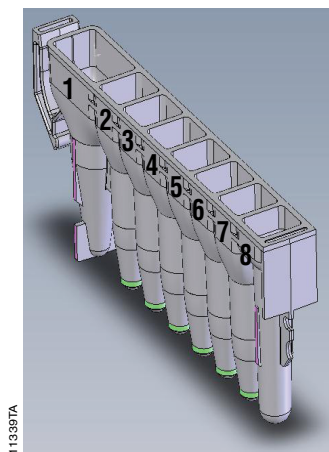
2. Umieścić jeden tłoczek w dołku nr 8 każdego kartridża.
3. Umieścić pustą próbkę do elucji w położeniu próbki do elucji dla każdego kartridża na tacach blatowych.
Uwaga: Należy używać wyłącznie próbek do elucji dostarczonych w zestawie Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Inne próbki do elucji mogą nie być zgodne z aparatami Maxwell® CSC Instrument, co może wpłynąć na wynik oczyszczania DNA.
4. Na dnie każdej próbki do elucji umieścić 50–100 µl buforu do elucji.
Uwaga: Należy używać wyłącznie buforu do elucji dostarczonego w zestawie Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Stosowanie innych buforów do elucji może wpłynąć na wynik oczyszczania DNA.

Uwagi dotyczące przygotowania kartridży Maxwell® CSC Blood DNA Cartridge



Wycieki próbki lub odczynnika na dowolną część tacy blatowej należy usuwać za pomocą roztworu detergentu i wody. Następnie należy spryskać powierzchnię sprayem bakteriobójczym lub wytrzeć ściereczką i przemyć ją wodą. Nie należy stosować wybielacza do czyszczenia części urządzenia.

5.B. Przygotowanie kartridży Maxwell® CSC Blood DNA Cartridge (ciąg dalszy)



Zawartość dolka dodawana przez użytkownika:

1. Próbkę pełnej krwi poddana lizie
8. Tłoczek CSC/RSC

Rysunek 1. Kartridż Maxwell® CSC Cartridge. Lizowana próbka pełnej krwi jest dodawana do dolka nr 1, a tłoczek jest wprowadzany do dolka nr 8.



Rysunek 2. Ustawianie i konfiguracja tacy blatowej. Bufor do elucji jest dodawany do probówek do elucji w wskazany sposób.

6. Przebieg pracy aparatu

Więcej informacji znajduje się w instrukcji technicznej określonego urządzenia Maxwell® CSC Instrument. Patrz Tabela 1.

1. Włączyć urządzenie Maxwell® Instrument i tablet. Zalogować się na tablecie i uruchomić oprogramowanie Maxwell® IVD Mode, dwukrotnie dotykając ikony na pulpicie. Urządzenie przeprowadzi autotest i ustawi w położeniu wyjściowym wszystkie ruchome części.
2. Wybrać opcję **Start** na ekranie głównym.
3. Zeskanować lub wprowadzić kod kreskowy znajdujący się w prawym górnym rogu etykiety zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit i nacisnąć przycisk **OK**, aby automatycznie wybrać metodę, która zostanie zastosowana (Rysunek 3).

Uwaga: Kod kreskowy metody zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit jest wymagany do przeprowadzenia oczyszczania DNA przy użyciu aparatów Maxwell® CSC Instrument. Etykieta zestawu zawiera dwa kody kreskowe. Kod kreskowy metody pokazano na Rysunku 3. Jeżeli nie można zeskanować kodu kreskowego, należy skontaktować się z działem Promega Technical Services.



Rysunek 3. Etykieta zestawu z kodem kreskowym do zeskanowania. Zeskanować kod kreskowy znajdujący się w czerwonym polu w prawym górnym rogu etykiety zestawu, aby rozpocząć cykl oczyszczania.

4. Na ekranie „Konfiguracja kartridży” dotknąć pozycji kartridża, aby zaznaczyć lub odznaczyć wszelkie położenia, które mają zostać użyte w ramach przebiegu ekstrakcji. Wprowadzić wymagane dane identyfikacyjne próbek i nacisnąć przycisk **Rozpocznij**, aby kontynuować.

Uwaga: Podczas użytkowania aparatu Maxwell® CSC 48 Instrument nacisnąć przycisk **Przód** lub **Wstecz**, aby wybrać lub cofnąć wybór pozycji kartridża na każdej tacy blatowej.

6. Przebieg pracy aparatu (ciąg dalszy)

5. Po otwarciu drzwi potwierdzić, czy wykonano wszystkie czynności z listy kontrolnej ekstrakcji. Sprawdzić, czy wstępnie przetworzone próbki zostały dodane do dolka nr 1 kartridży, czy kartridże zostały załadowane do aparatu, czy otwarte próbówki do elucji zawierające bufor do elucji są obecne oraz czy tłoczki zostały umieszczone w dolku nr 8. Przenieść tacę blatową zawierającą przygotowane kartridże do platformy aparatu Maxwell®.

Wkładanie tacy blatowej Maxwell®: Stojak na kartridże należy trzymać za brzegi, aby uniknąć wypadnięcia kartridży. Upewnić się, że taca blatowa została umieszczona w aparacie Maxwell® w taki sposób, że próbówki do elucji znajdują się możliwie jak najbliżej drzwi. Przetawić tył stojaka na kartridże w dół i ustawić ją na urządzeniu tak, aby jej tył był oparty o tylną część platformy urządzenia. Docisnąć przednią część stojaka na kartridże, aby osadzić go na platformie urządzenia. W przypadku trudności z ustawieniem stojaka na kartridże na platformie sprawdzić, czy stojak na kartridże jest ułożony w prawidłowej orientacji. Upewnić się, że stojak na kartridże jest odpowiednio wyrównany i osadzony na platformie urządzenia.

Uwaga: Sprawdzić identyfikator na stojakach na kartridże Maxwell® z 24 pozycjami, aby określić, czy powinny zostać umieszczone z przodu, czy z tyłu urządzenia.

6. Nacisnąć przycisk **Start**, aby rozpocząć przebieg ekstrakcji. Platforma zostanie wsunięta, a drzwi zostaną zamknięte.

Uwaga: W przypadku korzystania z aparatu Maxwell® Instrument z 48 pozycjami i włączenia systemu wizualizacji skanowanie tac blatowych rozpocznie się po zamknięciu drzwi. Wszelkie błędy w konfiguracji stojaków na kartridże (np. tłoczki nieznajdujące się w dolku nr 8, brak otwartych próbówek do elucji) spowoduje, że oprogramowanie powróci do ekranu „Konfiguracja kartridży”, a problematyczne pozycje zostaną oznaczone wykrzyknikiem w czerwonym okręgu. Dotknąć wykrzyknika, aby uzyskać opis błędu i rozwiązać problemy związane z błędami. Ponownie dotknąć przycisku **Start**, aby powtórzyć skanowanie tac blatowych i rozpocząć przebieg ekstrakcji.



Ostrzeżenie: Niebezpieczeństwo zmiążdżenia.

7. Urządzenie Maxwell® Instrument natychmiast rozpocznie cykl oczyszczania. Na ekranie będą wyświetlane wykonywane kroki oraz przybliżony czas do zakończenia cyklu.

Uwagi:

1. Dotknięcie przycisku **Przerwij** spowoduje przerwanie przebiegu. Wszystkie próbki z przerwanej przebiegu zostaną utracone.
 2. Jeśli przebieg zostanie przerwany przed ukończeniem, może wyświetlić się monit z prośbą o sprawdzenie, czy tłoczki są nadal załadowane na słupku tłoczków. Jeśli tłoczki znajdują się na słupku tłoczków, należy przeprowadzić procedurę **Czyszczenie** po wyświetleniu monitu. Jeśli tłoczki nie znajdują się na słupku tłoczków, można pominąć procedurę **Czyszczenie** po wyświetleniu monitu. Próbkki zostaną utracone.
8. Po zakończeniu przebiegu w interfejsie użytkownika zostanie wyświetlony komunikat informujący o zakończeniu metody.

Koniec przebiegu

9. Po zakończeniu metody postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie, aby otworzyć drzwi. Sprawdzić, czy tłoczki znajdują się w dołku nr 8 kartridża po zakończeniu cyklu. Jeśli tłoczki nie zostaną usunięte ze słupka tłoczków, należy postępować zgodnie z wytycznymi przedstawionymi w instrukcji obsługi określonego aparatu Maxwell® Instrument (patrz Tabela 1), aby przeprowadzić procedurę **Czyszczenie** i podjąć próbę rozładunku tłoczków.

10. Wyjąć stojaki na kartridże z urządzenia natychmiast po zakończeniu cyklu, aby zapobiec odparowaniu eluatów. Wyjąć próbki do elucji zawierające DNA i zamknąć próbówki.

Uwaga: Po zakończeniu procedury automatycznego czyszczenia tace blatowe mogą być nagrzane.

Podczas zdejmowania tacy blatowej z platformy aparatu trzymać ją za krawędzie.

Przed uruchomieniem protokołu odkażania przy użyciu promieniowania ultrafioletowego upewnić się, że próbki zostały usunięte z aparatu w celu zapobieżenia uszkodzeniu oczyszczonego kwasu nukleinowego.



11. Wyjąć kartridże i tłoczki z tac blatowych Maxwell®. Zutylizować je jako odpady niebezpieczne zgodnie z procedurami obowiązującymi w instytucji. Nie wolno ponownie używać kartridży Maxwell® CSC Cartridges, tłoczków CSC/RSC ani próbek do elucji.

7. Czynności po zakończeniu oczyszczania

Ustalić, czy stężenie i czystość próbki oczyszczonego DNA spełniają wymogi wejściowe dla odpowiedniego oznaczenia diagnostycznego w kierunku replikacji przed ich wykorzystaniem w tym oznaczeniu.

8. Ocena wydajności analitycznej

Ocenę wydajności analitycznej zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit przeprowadzono z wykorzystaniem próbek pełnej krwi na aparacie Maxwell® CSC Instrument. Równoważną wydajność zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit z aparatem Maxwell® CSC 48 Instrument wykazano w ramach prac rozwojowych tego aparatu.

8.A. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji DNA

Tabela 2. Uzysk i czystość DNA z próbek pełnej krwi o różnej liczbie białych krwinek. Ekstrakcję DNA z ośmiu powtórzeń badano pod kątem każdego wymienionego warunku w celu oceny ilości, jakości i zdolności do amplifikacji DNA. DNA wyekstrahowano z 300 μ l krwi pełnej o liczbie białych krwinek (WBC) w zakresie 4×10^6 – 10×10^6 WBC/ml i eluowano w 50 μ l. Absorbancję oczyszczonego DNA mierzono przy długości fali 230 nm, 260 nm, 280 nm i 340 nm. Stężenie DNA określono przy użyciu absorbancji na poziomie 260 nm po odjęciu absorbancji próby ślepej i skorygowaniu o szumy aparatu (absorbancja na poziomie 340 nm). Wszystkie wyliczenia absorbancji opisane w niniejszej ocenie wydajności przeprowadzono w ten sposób. Aby określić uzysk, stężenie DNA pomnożono przez objętość eluowanego DNA, natomiast aby ocenić jakość DNA, obliczono stosunki A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} . Zestaw Maxwell® CSC Blood DNA Kit dostarczył akceptowalnych ilości DNA ($\geq 3,00$ pg/WBC) ze wszystkich badanych próbek pełnej krwi, niezależnie od liczby białych krwinek. Średni uzysk oczyszczonego DNA wynosił $\geq 4,18$ pg/WBC, przy czym stosunek A_{260}/A_{280} wynosił $\geq 1,89$, a stosunek A_{260}/A_{230} $\geq 1,68$.

Dawca	Średni całkowity uzysk DNA (μ g) (n = 8)	Liczba białych krwinek (WBC/ml)	Średni uzysk DNA na krwinkę białą (pg)	Średni stosunek A_{260}/A_{280}	Średni stosunek A_{260}/A_{230}
1	6,0	$4,5 \times 10^6$	4,45	1,90	1,68
2	8,6	$6,9 \times 10^6$	4,18	1,89	1,91
3	12,4	$9,4 \times 10^6$	4,45	1,91	2,01

Tabela 3. Uzysk i czystość DNA z krwi pełnej pobranej z wykorzystaniem różnych antykoagulantów.

Ilość i jakość oceniano dla eluatów oczyszczonego DNA przygotowanych z krwi pełnej pobranych do powszechnie stosowanych probówek do pobierania krwi zawierających EDTA, cytrynian sodu lub heparynę jako antykoagulant. Przed ekstrakcją DNA próbki krwi schłodzone lub zamrożone, po czym wyrównano ich temperaturę z temperaturą pokojową. DNA oczyszczono z ośmiu powtórzeń o pojemności 300 µl dla każdego antykoagulantu i eluowano w 50 µl. Obliczono stężenie DNA, uzysk DNA oraz stosunki A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} i przedstawiono je w poniższej tabeli. W DNA wyekstrahowanym ze wszystkich próbek przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit zaobserwowano spójne wartości uzysku i stosunki czystości.

Typ probówek do pobierania krwi	Średni całkowity uzysk DNA (µg) (n = 8)	Średnie stężenie DNA (ng/µl)	Średni stosunek A_{260}/A_{280}	Średni stosunek A_{260}/A_{230}
EDTA	10,97	281,28	1,91	1,94
Cytrynian sodu	11,29	283,57	1,93	2,02
Heparyna	11,99	307,48	1,94	2,08

8.A. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji DNA (ciąg dalszy)

Tabela 4. Amplifikacja DNA wyekstrahowanego z krwi pełnej. Zdolność do amplifikacji DNA wyekstrahowanego z krwi pełnej oceniano metodą qPCR przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit i aparatu Maxwell® CSC Instrument. Każda oczyszczona próbka DNA została poddana amplifikacji przy użyciu sekwencji docelowej CAPZA3 o długości 71 bp. Wartości C_q , które były niższe od najniższego stężenia na krzywej standardowej qPCR, obserwowano w przypadku wszystkich typów próbek i mieściły się one w zakresie liniowym testu.

Objętość krwi pełnej	Próbka	C_q (cykle)
50 μ l	1	27,17
	2	26,86
	3	26,95
	4	26,92
	5	27,23
	6	27,12
	7	27,21
	8	26,98
300 μ l	1	26,90
	2	26,78
	3	26,84
	4	26,87
	5	26,66
	6	26,66
	7	26,84
	8	26,75

8.B. Odtwarzalność

Tabela 5. Odtwarzalność pomiędzy różnymi użytkownikami i dniami. Odtwarzalność oczyszczania DNA określono dla różnych użytkowników i dni przy użyciu ośmiu powtórzeń z jednej próbki krwi w następujący sposób:

- W celu scharakteryzowania odtwarzalności u różnych użytkowników trzech użytkowników oczyszczało DNA z powtórzeń tej samej próbki krwi pełnej przy użyciu tego samego aparatu Maxwell® CSC Instrument i tego samego dnia, z jednym przebiegiem oczyszczania na użytkownika.
- W celu scharakteryzowania odtwarzalności w różnych dniach jeden z użytkowników oczyszczał DNA z powtórzeń tej samej próbki krwi przy użyciu tego samego aparatu Maxwell® CSC Instrument, z jednym przebiegiem dziennie przez łącznie 5 dni.

We wszystkich przebiegach oczyszczania wykorzystano osiem powtórzeń po 300 µl pełnej krwi. Dla poszczególnych użytkowników i dni oraz pomiędzy nimi obliczono średni uzysk, stosunki A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} oraz procentowy współczynnik zmienności (% CV). Uzyski i współczynniki czystości DNA wyekstrahowanego przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit były powtarzalne dla wszystkich badanych zmiennych.

	Zmienna	Średni całkowity uzysk DNA (µg) (n = 8)	% CV	Średni stosunek A_{260}/A_{280}	% CV	Średni stosunek A_{260}/A_{230}	% CV
Użytkownik	1	11,18	5,7	1,93	0,2	2,00	3,4
	2	10,02	8,8	1,91	0,2	1,92	5,2
	3	12,27	4,2	1,92	0,3	1,92	4,4
Średnia dla trzech różnych użytkowników		11,16	10,3	1,92	0,4	1,95	4,6
Dzień	1	11,88	5,3	1,93	0,4	1,93	5,1
	2	12,27	4,2	1,92	0,3	1,92	4,4
	3	12,78	6,9	1,93	0,3	1,93	3,6
	4	11,31	8,6	1,91	0,3	1,89	4,6
	5	12,92	5,5	1,93	0,3	1,92	3,0
Średnia z pięciu różnych dni		12,23	7,7	1,92	0,4	1,92	4,1

8.C. Substancje zakłócające (inhibicja)

Tabela 6. Inhibicja amplifikacji DNA wyekstrahowanego z krwi pełnej zawierającej różne antykoagulanty.

Inhibicję amplifikacji DNA oceniano na DNA wyekstrahowanym z krwi pełnej przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit i aparatu Maxwell® CSC Instrument. DNA oczyszczano z próbek krwi pełnej o objętości 300 µl pobranych w probówkach z EDTA, heparyną i cytrynianem sodu, z ośmioma powtórzeniami dla każdego typu probówki. Wpływ substancji zakłócających, które mogą być obecne w wyekstrahowanym DNA, został scharakteryzowany przy użyciu dostępnego na rynku egzogenego dodatniego DNA kontrolnego. Egzogeny dodatni DNA kontrolny amplifikowano w obecności i bez obecności eluatu DNA z każdego powtórzenia krwi pełnej, a wyniki zostały poddane porównaniu w celu określenia, czy w eluatach DNA występowały inhibitory. Różnicę w wartości C_q (ΔC_q) dla dwóch amplifikacji wyliczono, odejmując wartość C_q amplifikacji DNA kontrolnego od wartości C_q amplifikacji zawierającej DNA wyekstrahowany przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Wartość ΔC_q mniejsza niż 2 cykle wskazuje, że wszelkie przeniesienie inhibitorów z próbek do pobierania krwi, krwi pełnej lub odczynników do oczyszczania DNA miało ograniczony wpływ na amplifikację. Średnie wartości ΔC_q dla wszystkich eluatów DNA wynosiły $\leq 1,87$ cyklu, wykazując, że w DNA wyekstrahowanym przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit nie wykryto żadnych inhibitorów amplifikacji DNA.

	Średnia wartość C_q (cykle amplifikacji; n = 8)	Średnia wartość ΔC_q (cykle amplifikacji; n = 8)
Bez eluatu	30,49	Nd.
EDTA	32,36	1,87
Heparyna	31,85	1,36
Cytrynian sodu	32,19	1,70

8.D. Zanieczyszczenie krzyżowe

Aby ocenić, czy podczas ekstrakcji DNA doszło do zanieczyszczenia krzyżowego, na tacy kartridża aparatu Maxwell® CSC Instrument umieszczano na przemian próbki krwi pełnej mężczyzn i kobiet. Oczyszczony DNA poddano amplifikacji przy użyciu testu qPCR specyficznego dla chromosomu Y w celu wykrycia męskiego DNA i sprawdzenia, czy w eluatach z próbek żeńskich nie było zanieczyszczającego DNA chromosomu Y. Każdy wynik stężenia poniżej najniższego stężenia na krzywej standardowej oznacza brak obecności zanieczyszczającego DNA. Podczas oczyszczania DNA przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit i aparatu Maxwell® CSC Instrument nie wykryto żadnego zanieczyszczenia krzyżowego.

9. Ocena wydajności klinicznej

Ocena wydajności klinicznej zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit została przeprowadzona przez zewnętrzne laboratorium kliniczne z wykorzystaniem próbek ludzkiej krwi na aparacie Maxwell® CSC Instrument.

9.A. Zdolność amplifikacji DNA

Tabela 7. Amplifikacja DNA wyekstrahowanego z krwi pełnej przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit i laboratoryjnej metody referencyjnej. Aby ocenić zdolność do amplifikacji DNA, oczyszczono DNA z 16 różnych próbek krwi, wykorzystując 50 µl objętości wejściowej próbek i 100 µl objętości elucji. DNA oczyszczono również z tych samych próbek krwi przy użyciu 300 µl objętości wejściowej próbki i 50 µl objętości elucji na poczet objętości wejściowej i elucji do zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit. DNA z tych samych próbek oczyszczono przy użyciu standardowej laboratoryjnej metody oczyszczania kwasów nukleinowych (laboratoryjna metoda referencyjna) w celu porównania. Eluowanego DNA użyto jako szablonu w molekularnym teście diagnostycznym laboratorium klinicznego pod kątem JAK2 V617F, aby wykazać, że wyekstrahowany DNA może być amplifikowany przy użyciu testu qPCR. Ten test qPCR wykorzystuje dwa zestawy starterów, jeden specyficzny dla genu typu dzikiego i drugi specyficzny dla mutanta V617F. Ponieważ zamierzeniem oceny wydajności klinicznej było wykazanie, że DNA wyekstrahowany przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit może być amplifikowany w teście diagnostycznym opartym na amplifikacji, a nie badanie czułości i swoistości testu diagnostycznego, w tym badaniu wykorzystano jedynie dane qPCR typu dzikiego.

Uzysk i wyniki qPCR DNA uzyskanego z tych samych próbek przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit i laboratoryjnej metody referencyjnej poddano porównaniu. W próbkach wyekstrahowanych przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit wykorzystywano połączenie najmniejszej wejściowej objętości krwi (50 µl) i największej objętości elucji (100 µl), aby reprezentowało minimalną wydajność zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit, podczas gdy w ramach laboratoryjnej metody referencyjnej wykorzystano jej standardowe objętości wejściowe i elucji wynoszące po 400 µl. Stężenie DNA, mierzone jako ng/µl, oznaczano dla 16 oddzielnych próbek krwi metodą absorpcji przy 260 nm. Przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit wykazano podobny uzysk DNA we wszystkich próbkach w porównaniu do laboratoryjnej metody referencyjnej; stosunek uzysku DNA z zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit do laboratoryjnej metody referencyjnej był mniejszy niż 2. W przypadku wszystkich próbek otrzymano wartość C_q w prawidłowym zakresie 10–35.

Liczba badanych próbek	Wejściowa objętość próbki	Objętość elucji	Maxwell® CSC spełnia	
	Maxwell® CSC (µl)	Maxwell® CSC (µl)	kryteria akceptacji (wartość C_q w zakresie liniowym)	Zgodność Maxwell® CSC z laboratoryjną metodą referencyjną dla uzysku DNA
16	50	100	16 z 16	16 z 16
16	300	50	16 z 16	Laboratoryjna metoda referencyjna nie badana przy tej objętości wejściowej/elucji

9.B. Odtwarzalność

Tabela 8. Powtarzalność pomiędzy testerami. 2 różnych testerów oczyściło DNA z 8 różnych próbek krwi pełnej przy użyciu aparatu Maxwell® CSC Instrument i zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit. W celu określenia uzysku eluaty z każdej próbki badano dwukrotnie metodą qPCR, zgodnie z procedurą amplifikacji JAK2 V617F stosowaną w laboratorium klinicznym, przy czym do tej analizy wykorzystano dane z testu typu dzikiego. Porównano uzysk i wyniki testu qPCR DNA uzyskanego z tych samych próbek przez dwóch różnych testerów przy użyciu systemu Maxwell® CSC dla dwóch różnych kombinacji objętości wejściowych i elucji, wykorzystując 8 różnych próbek dla każdej kombinacji. DNA ze wszystkich próbek uzyskanych przez obu testerów dało wartość C_q w prawidłowym zakresie 10–35. Stężenie DNA, mierzone jako ng/ μ l DNA w eluacie, określano na podstawie absorbancji przy 260 nm, a stosunek uzysku DNA otrzymanego z tej samej próbki przez testera 1 do uzysku otrzymanego przez testera 2 wynosił dla wszystkich próbek od 0,5 do 2,0.

Liczba próbek na testera	Wejściowa objętość próbki Maxwell® CSC (μ l)	Objętość elucji Maxwell® CSC (μ l)	Wartość Ct w zakresie liniowym analizy; 8 próbek na testera	Zgodność między testerem 1 i testerem 2
8	50	100	16 z 16	8 z 8
8	300	50	16 z 16	8 z 8

9.C. Zanieczyszczenie krzyżowe

Zanieczyszczenie krzyżowe podczas oczyszczania DNA w zamierzonym środowisku użytkownika oceniano dla eluatów przygotowanych z krwi pełnej przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Blood DNA Kit i aparatu Maxwell® CSC Instrument. Próbkę krwi i kontrole ujemne (próby ślepe z wodą) umieszczano na przemian na tacy kartridża Maxwell® CSC. DNA oczyszczono z 8 różnych próbek krwi, o objętości wejściowej próbki 300 μ l i objętości elucji 50 μ l, oraz z 8 próbek kontroli ujemnej.

Eluaty z każdej próbki kontroli ujemnej badano dwukrotnie metodą qPCR zgodnie z procedurą amplifikacji JAK2 V617F stosowaną w laboratorium badawczym. Wszystkie kryteria akceptacji zostały spełnione. W żadnym z eluatów kontroli ujemnej nie wykryto zanieczyszczającego DNA.

10. Rozwiązywanie problemów

W przypadku pytań, na które nie można znaleźć odpowiedzi w niniejszym dokumencie, należy skontaktować się z lokalnym oddziałem firmy Promega lub jej dystrybutorem. Informacje kontaktowe są dostępne pod adresem:

www.promega.com. Adres e-mail: **techserv@promega.com**

Objawy

Przyczyny i komentarze

Stężenie niższe niż oczekiwane

300 µl próbki pełnej krwi zawierającej od 4×10^6 do 10×10^6 krwinek białych na ml powinno zapewnić uzysk > 80 ng/µl genomowego DNA w objętości elucji 50 µl (pomiar jako absorbancja przy długości fali 260 nm).

W krwi poddanej wielokrotnym cykлом zamrażania i rozmrażania może dojść do degradacji DNA. Należy używać próbek, które zostały pobrane i były przechowywane w warunkach podanych w rozdziale 3.

Próbka pełnej krwi zawierała małą liczbę krwinek białych. Uzysk genomowego DNA z próbek krwi zależy od liczby krwinek białych obecnych w próbce.

Nie dodano roztworu proteinazy K, dodano niepełną objętość roztworu proteinazy K lub proteinaza K nie została dobrze zmieszana z próbką krwi przed dodaniem buforu lizującego. Liza i uzysk zależą od kompletnej ekstrakcji przy użyciu proteinazy K. Jeżeli nie dodano proteinazy K zgodnie z opisem w rozdziale 5.A, krok 3, uzyskana próbka krwi będzie czerwona. Próbkę, do której dodano proteinazę K, zmieniają kolor na zielonkawo-brązowy, co może służyć jako wskazówka wizualna potwierdzająca, że dodano proteinazę K do próbki.

Nie zmieszano próbki pełnej krwi przed przetworzeniem. Przed rozpoczęciem należy wymieszać próbki pełnej krwi w celu zapewnienia, że krwinki białe znajdują się w zawieszynie.

Czystość niższa niż oczekiwana

300 µl próbki pełnej krwi zawierającej od 4×10^6 do 10×10^6 krwinek białych na ml eluowanych w objętości 50 µl powinno zapewnić gDNA o stosunku A_{260}/A_{280} (czystość zmierzona jako absorbancja przy długości fali 260 nm podzielona przez absorbancję przy długości fali 280 nm) wynoszącym 1,7 lub wyższym oraz stosunku A_{260}/A_{230} (czystość zmierzona jako absorbancja przy długości fali 260 nm podzielona przez absorbancję przy długości fali 230 nm) wynoszącym 1,5 lub wyższym.

Nie dodano roztworu proteinazy K, dodano niepełną objętość roztworu proteinazy K lub proteinaza K nie została dobrze zmieszana z próbką krwi przed dodaniem buforu lizującego. Liza i czystość zależą od kompletnej ekstrakcji przy użyciu proteinazy K. Jeżeli nie dodano proteinazy K zgodnie z opisem w rozdziale 5.A, krok 3, uzyskana próbka krwi będzie czerwona. Próbkę, do której dodano proteinazę K, zmieniają kolor na zielonkawo-brązowy, co może służyć jako wskazówka wizualna potwierdzająca, że dodano proteinazę K.

Wszelkie poważne incydenty, które miały miejsce w związku z urządzeniem, które doprowadziły lub mogą prowadzić do śmierci lub poważnych obrażeń użytkownika lub pacjenta, należy niezwłocznie zgłaszać producentowi. Użytkownicy mający siedzibę w Unii Europejskiej powinni również zgłaszać wszelkie poważne incydenty właściwemu organowi państwa członkowskiego, w którym użytkownik i/lub pacjent ma siedzibę.

11. Źródło

1. Henry, J.B. (2001) *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20th ed., W.B. Saunders Company, 509.

12. Powiązane produkty

Aparatura i akcesoria

Produkt	Ilość	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	1 szt.	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 szt.	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 szt.	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 szt.	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 szt.	AS8402
Microtube, 1,5 ml	1000 szt./zestaw	V1231

* Do stosowania w diagnostyce in vitro. Niniejszy produkt jest dostępny wyłącznie w niektórych krajach.

Zestawy odczynników Maxwell® CSC

Na stronie www.promega.com znajduje się lista dostępnych zestawów do oczyszczania Maxwell® CSC.

13. Podsumowanie zmian

W wersji 10/22 niniejszego dokumentu wprowadzono następujące zmiany:

1. Rozdział 3 została zmieniona na Przeznaczenie/zastosowanie produktu.
2. Dodano rozdziały 8 i 9, a kolejne zmieniły numerację.
3. Zaktualizowano pod kątem zgodności z Rozporządzeniem (UE) 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.

^(a)Amerykańska publikacja patentowa nr 6,855,499 oraz inne patenty.

^(b)Amerykańska publikacja patentowa nr 7,329,488 oraz południowokoreańska publikacja patentowa nr 10-0483684.

© 2012–2022 Promega Corporation. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Maxwell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Promega Corporation.

Produkty mogą być przedmiotem zgłoszonych bądź przyznanych patentów lub mogą podlegać pewnym ograniczeniom. Więcej informacji można znaleźć na naszej stronie internetowej.

Wszystkie ceny i dane techniczne mogą ulec zmianie bez wcześniejszego powiadomienia.

Oświadczenia dotyczące produktów mogą ulec zmianie. Aby uzyskać aktualne informacje na temat produktów firmy Promega, należy skontaktować się z działem Promega Technical Services lub zapoznać się z katalogiem produktów firmy Promega dostępnym w Internecie.