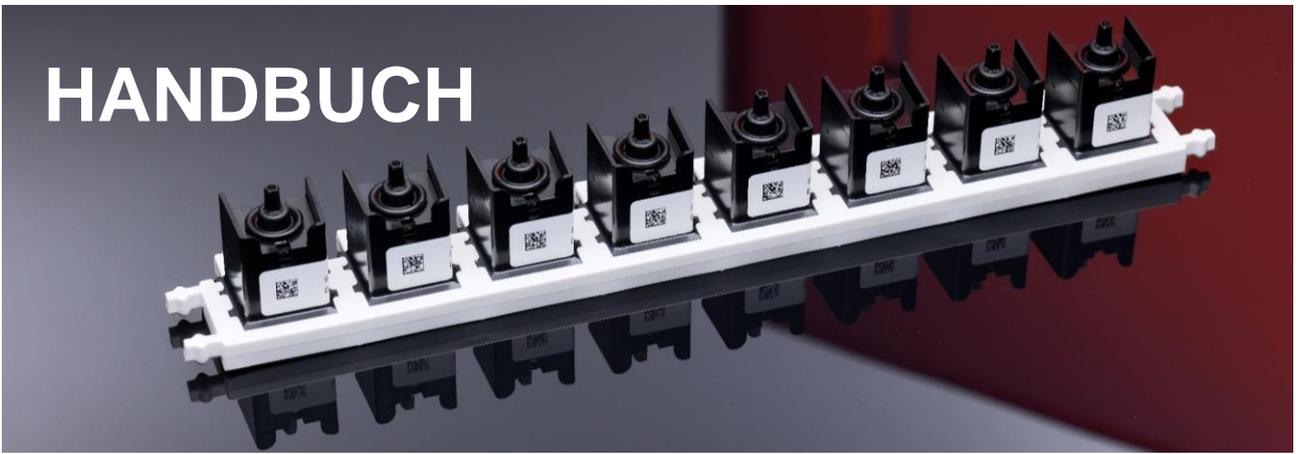


HANDBUCH



CUBE-MA-20005-V03-D
© 2020 Cube Dx GmbH



Januar, 2020.

IPC

REF HC0471-25

GINA 500

REF HC0400-50

GINA 500 + DNA Purification

REF HC0404-50

*Kit zur Anreicherung von Bakterien- und Pilz-DNA aus humanen Vollblut
oder anderen humanen Probenarten (einschließlich DNA-Aufreinigung)
inklusive Interner Prozesskontrolle (IPC).*



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	2
Erläuterung der Symbole	3
Einleitung und Zweckbestimmung	4
Technische Beschreibung	4
Bestandteile des Produkts	5
Lagerung und Haltbarkeit	6
Benötigtes Zubehör	6
Anreicherungs- (und Reinigungs-) Ablauf	7
Leistungsdaten	9
Entsorgung	9
Troubleshooting	9

Abkürzungsverzeichnis

°C.....	Grad Celsius	IVD	In-vitro-Diagnostikum
µL.....	Mikroliter	LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
bzw.	beziehungsweise	Min.....	Minimum
CE.....	Conformité Européenne (Europäische Konformität)	mL	Milliliter
DNA	Desoxiribonucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)	(q)PCR	(quantitative) Polymerase Chain Reaction
DNase	Deoxyribonuklease	((quantitative) Polymerase Kettenreaktion)
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure	RT.....	Raumtemperatur
g.....	Gravitation	UV	Ultraviolett
		z.B.	zum Beispiel



Erläuterung der Symbole

Symbol	Erläuterung
 	CE-Konformitätskennzeichnung. In-vitro-Diagnostikum.
	Hersteller.
	Lotnummer / Charge.
	Artikelnummer.
	Seriennummer.
	Trocken aufbewahren.
	Vor Sonnenlicht schützen.
	Einmaliger Gebrauch. Nicht wiederverwenden.
	Bei beschädigter Verpackung nicht verwenden.
	Nicht essen und trinken.
	Verwendbar bis.
	Temperaturbegrenzung.
	Ausreichend für <n> Prüfungen.
R 22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
S 1/2	Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren.
S 18	Behälter mit Vorsicht öffnen und handhaben.
S 20	Bei der Arbeit nicht essen und trinken.
S 24/25	Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.
S 36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.



Einleitung und Zweckbestimmung

GINA-Kits zur Anreicherung von Pathogenen (optional inklusive DNA-Aufreinigung) entfernen die überwiegende Mehrheit menschlicher (Blut-)Zellen und Zellreste aus Vollblut und aus anderen Proben. Das Verfahren ist dafür ausgelegt den Anteil pathogener (bakterieller und fungaler) DNA intakter Pathogenen im Verhältnis zu menschlicher DNA in der resultierenden Lösung drastisch zu erhöhen und eine bessere Ausgangsposition für nachfolgende PCR-Reaktionen zu schaffen.

Qualitätssicherungskonzepte für die hochsensitive molekulare Pathogenidentifikation aus humanen Proben müssen sicherstellen, dass negative Ergebnisse auf negative Proben und nicht auf Fehler im Prozess zurückzuführen sind. Daher muss eine stringente Prozesskontrolle den gleichen Prozess durchlaufen wie die Probe selbst – ohne dabei die Sensitivität des Tests zu beeinflussen. Cube Dx' Interne Prozesskontrolle (IPC) besteht aus gefrorenem biologischem Material, das in der humanen Probe gelöst wird. Die IPC wird den gleichen Extraktionsverfahren unterzogen wie die Probe selbst. Die darauf folgende PCR und der hybcell Test bestätigen die Präsenz der IPC DNA und dadurch die Gültigkeit des Tests.

Der Test muss in einer für molekularbiologisches Arbeiten geeigneten Umgebung durchgeführt werden. Dies beinhaltet DNA- und DNase-freie Pipetten, getrennte Räume für die DNA-Isolierung und Amplifikation / Detektion sowie die Möglichkeit der UV-Dekontamination. **Der Test sollte ausschließlich von qualifiziertem Personal, das in der Verwendung von Cube Dx' Produkten für die Identifikation von Pathogenen geschult wurde, durchgeführt werden.**

Zur Abarbeitung von GINA-Kits werden eine Tischzentrifuge mit einem Rotor für 2 mL Tubes (bis 11.000g, Eppendorf, Hermle, etc.) und ein herkömmlicher Heizblock (bis zu 100 °C, Analytic Jena, Coyote Bioscience) benötigt.

Der Kit ist nicht für die anschließende quantitative Bestimmung von Erregern (im Sinne von koloniebildenden Einheiten) in der Probe vorgesehen.

Technische Beschreibung

Der Verlauf bei einer Sepsis oder anderer schwerer Infektionen und vor allem die Heilungs- und Überlebenschancen hängen von der frühzeitigen und schnellen Identifikation des / der verursachenden Erreger(s) ab.

Die Überlebens- und Erholungschancen nach Sepsis und anderen schweren Infektionen sind nach einer frühzeitigen Erkennung des / der verursachenden Erreger(s) und einer gezielten Behandlung höher.

Cube Dx' Interne Prozesskontrolle (IPC) besteht aus gefrorenem biologischem Material, das in der Probe gelöst wird. Dieses biologische Material ähnelt pathogenen Mikroorganismen, die eine Sepsis oder andere schwere Infektionen verursachen.

Der Kit *GINA 500* (für 500 µL Probenflüssigkeit mit oder ohne DNA-Reinigung) ist für die klinische Routineanwendung zur Anreicherung pathogener (bakterieller, fungaler) DNA vorgesehen. Nach der Anreicherung wird die Lösung gereinigt und das Eluat wird beispielsweise in PCR-Reaktionen verwendet (z. B. bakterielle DNA, fungale DNA, Resistenzmarkergene). Für den Fall, dass PCR-Produkte in der Probe amplifiziert wurden kann das jeweilige Pathogen direkt durch Cube Dx' *compact sequencing* identifiziert werden.

Der Test basiert auf folgenden Prozessschritten:

- **Lyse und Entfernung menschlicher Zellen:** Die Probe wird in die LE-Lösung gegeben und die Mehrheit menschlicher (und beschädigter Pathogen-)Zellen werden lysiert und durch Zentrifugation entfernt.



- Lyse von Pathogenzellen: NA-Lösung wird zugegeben und inkubiert. Verbleibende Pathogenzellen werden lysiert.
- Neutralisation: Das Lysat wird in die T-Lösung überführt, um den Lyseprozess zu stoppen und die resultierende Lösung zu neutralisieren.
- zugehörige DNA-Reinigung: Filtersäulchen werden für die Aufreinigung der DNA aus der GINA-Lösung verwendet.

Es besteht die Möglichkeit, dass das Ergebnis durch die Art der Probe oder Fehler während des Verfahrens (geringe Menge an DNA, Kontamination mit Umweltpathogenen / DNA), andere Einflüsse (abgebaute DNA, Kontamination mit Chemikalien) oder technische Fehler verfälscht werden.

Folgende Umstände können das Verderben der Probe verursachen:

- die Zeit zwischen der (Blut-)Probennahme und dem Beginn der Probenaufbereitung beträgt mehr als 4 Stunden;
- während der Probennahme und dem Beginn der Probenaufbereitung wurde die Probe nicht entsprechend der Spezifikation gelagert (korrekt: trocken und zwischen 4 °C und 8 °C lagern).

Bestandteile des Produkts

Interne Prozesskontrolle (IPC):

- *IPC* (Bestellnummer HC0471-25): bei **-15 bis -25 °C** lagern
 - 25 x 20µL IPC
 - (25 x einzeln verpackte 0,5 mL Mikroreaktionsgefäße mit biologischem Material (IPC, je 20 µL))

Um Pathogene (Bakterien und Pilze) aus 500 µL (oder weniger) Probenflüssigkeit anzureichern, sind folgende Produkte notwendig:

- *GINA 500* (Bestellnummer HC0400-50): bei **Raumtemperatur (8 bis 25 °C)** lagern
 - 2 x 25 *LE solution* (1400µL); (2 x 25 x 2mL Tubes mit gelber Verschlusskappe)
 - 1 x 12mL *NA solution* (rote Markierung auf Fläschchen und Verschlusskappe)
 - 1 x 25mL *T solution* (grüne Markierung auf Fläschchen und Verschlusskappe)

Um Pathogene (Bakterien und Pilze) aus 500 µL (oder weniger) Probenflüssigkeit anzureichern und die DNA zu aufzureinigen, sind folgende Produkte notwendig:

- *GINA 500 + DNA Purification* (Bestellnummer HC0404-50): bei **Raumtemperatur (8 bis 25 °C)** lagern
 - 2 x 25 *LE solution* (1400µL); (2 x 25 x 2mL Tubes mit gelber Verschlusskappe)
 - 1 x 12mL *NA solution* (rote Markierung auf Fläschchen und Verschlusskappe)
 - 1 x 25mL *T solution* (grüne Markierung auf Fläschchen und Verschlusskappe)
 - 1 x 30mL *Wash Buffer BW* (Fläschchen)
 - 1 x 60mL *Wash Buffer B5* (Fläschchen)
 - 1 x 13mL *Elution Buffer BE* (Fläschchen)
 - 50 x *Column* (Filtersäulchen)
 - 50 x *Collection Tube* (Sammelröhrchen)
 - 50 x *Elution Tube* (Elutionsröhrchen)



Bitte beachten Sie, die Komponenten unterschiedlicher Lots nicht zu mischen!

Lagerung und Haltbarkeit

Die Mindesthaltbarkeit der Produkte ist nur garantiert, wenn die erforderlichen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen während des Transports und der Lagerung gewährleistet sind. Das Ablaufdatum der Produkte ist auf den Produktlabels angegeben (Kalenderwoche des Ablaufens).

IPC wird gefroren geliefert und muss bei **-15 bis -25 °C** gelagert werden.

GINA 500 und GINA 500 + DNA Purification werden unter Raumtemperatur angeliefert und müssen bei **Raumtemperatur (8 bis 25 °C)** gelagert werden.

Ist die Verpackung (z. B. Tubes) beschädigt oder das Mindesthaltbarkeitsdatum überschritten, darf das Produkt / die Komponente nicht verwendet werden. Das Auftauen und wieder Einfrieren der IPC zerstört die IPC und ist daher nicht erlaubt. Die IPC muss unmittelbar nach dem Öffnen des Tubes verwendet werden.

Benötigtes Zubehör

Folgendes Zubehör wird für die Durchführung des Tests und die Reinigungsreaktion benötigt:

Erforderliches Zubehör / erforderliche Infrastruktur		REF
Mini Vortex Mixer	Fisher Scientific ¹	
DNA Werkbank	Starlab ² : Laminar Flow PCR Werkbank mit UV-Licht PEQLAB ³ : PCR-Arbeitsstation	N2530-8200 90-UV/PCR2
Pipetten: ▪ 20 – 200µL ▪ 100 – 1000µL	GILSON ⁴ : PIPETMAN P200N PIPETMAN P1000N	F144565 F144566
DNA-freie Filterspitzen: ▪ 200/300µL ▪ 1000µL	PEQLAB: 300 µL Biotix 1250 µL Biotix	M-0300-9FC M-1250-9FC96
Standardtischzentrifuge (für 2 mL Tubes)	Eppendorf ⁵ : Centrifuge 5430	
Standardheizblock	Coyote Bioscience ⁶ H2O3-H	

Notwendiges Zubehör.

¹ <https://www.fishersci.com/shop/products/variable-speed-mini-vortex-mix/14955163>

² <http://www.starlab.de>

³ <http://www.peqlab.de>

⁴ <http://www.gilson.com>

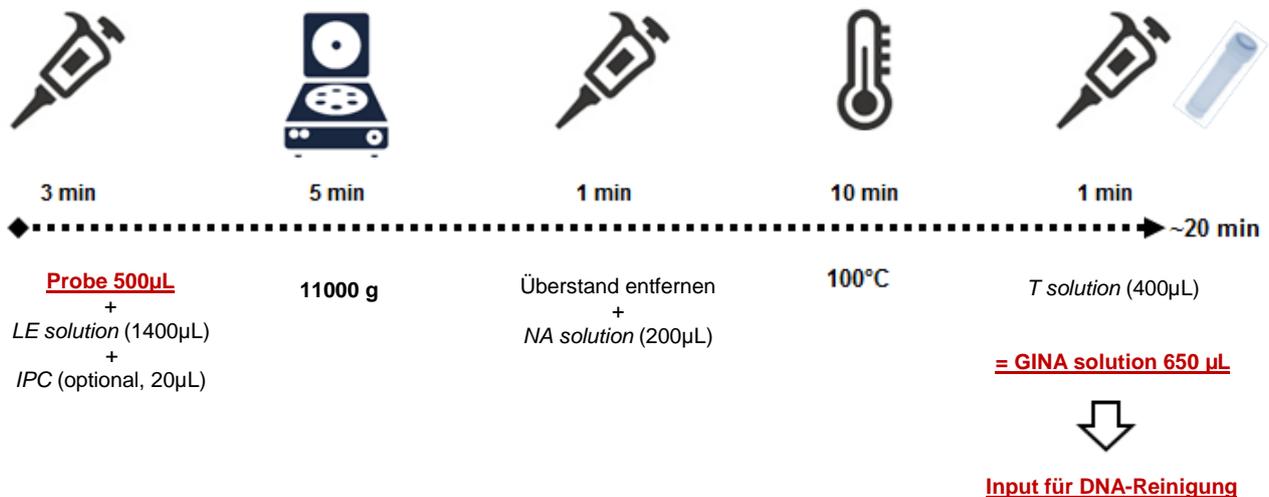
⁵ <http://www.eppendorf.com>

⁶ <http://www.coyotebio.com>



Anreicherungs- (und Reinigungs-) Ablauf

Das Verfahren beginnt mit 500µL einer EDTA-Vollblut-Probe.



Beachten Sie, dass einige Schritte des Verfahrens die Vorbereitung von Equipment oder Reagenzien erfordern. Da diese mit Wartezeiten verbunden sein können, lesen Sie vor dem Start das gesamte Kapitel des Ablaufs durch.

Während der Verarbeitung der Proben müssen ein Labormantel, Latexhandschuhe, Ärmelschutz, ein Haar- (und Bart-) Netz und ein Mundschutz getragen werden, um eine Kontamination der Testreagenzien zu vermeiden. Die Anreicherung von Pathogenen (siehe Schritte 2. - 8. unten, in rot) muss unter einer DNA-Laborbank erfolgen.

1. Stellen Sie sicher, dass alle Komponenten des Kits und das Equipment für die Verwendung bereitstehen. Die benötigten Röhren mit LE solution kurz abzentrifugieren, um das Verschütten von möglicherweise in den Schraubkappen vorhandenen Flüssigkeiten beim Öffnen der Fläschchen zu vermeiden. Heizen Sie den Heizblock auf 100°C auf.
2. Bereiten Sie die LE Solution und die Probe vor. Transferieren Sie 500 µL (oder weniger) EDTA Blut in die LE solution (gelbe Verschlusskappe) und pipettieren Sie auf und ab um etwas zu vermischen. **Schütteln Sie die LE solution Tube (gelbe Kappe) nicht, um Schaumbildung zu vermeiden!**
3. Option: Pipettieren Sie 20µL IPC in die LE solution / EDTA Blut – Mischung (bitte IPC immer nach dem EDTA Blut einfüllen!)
4. Schließen Sie das Tube und markieren Sie es. Vortexen Sie für 5 Sekunden kräftig und invertieren Sie das Tube mehrmals. Inkubieren Sie ca. 2 Minuten bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C).
5. Zentrifugieren Sie für 5 Minuten zwischen 9000 und 11000g (bevorzugt mit 11000g). Falls verfügbar bitte die „Soft Ramping-Funktion“ der Zentrifuge verwenden.
6. Entfernen Sie den Flüssigkeitsüberstand vorsichtig durch **Dekantieren** und fügen Sie 200µL der NA solution (rote Verschlusskappe) in das Röhren mit der gelben Verschlusskappe. Den Schraubverschluss fest schließen.
 - Hinweis: Etwas Probenflüssigkeit (~ 50µL) kann nach dem Dekantieren oben auf dem Pellet bleiben. **Vollblutproben sollten an dieser Stelle grünlich werden.**

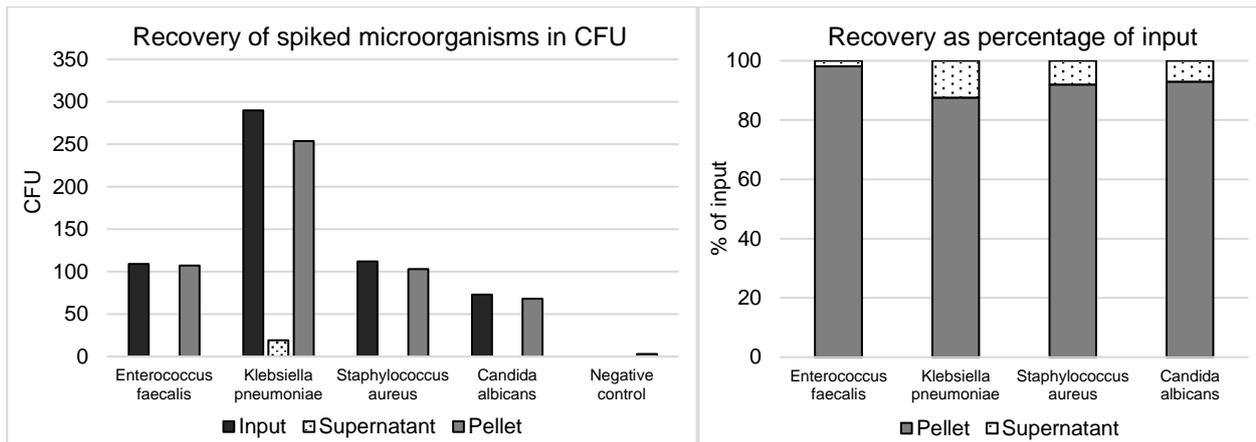


7. Vortexen Sie 5 Sekunden lang kräftig. Stellen Sie sicher, dass das Tube noch fest verschlossen ist.
8. Inkubieren Sie bei 100°C für 10 Minuten (+/- 1 Minute) mit einem Heizblock.
9. Fügen Sie 400µL der *T solution* (grüne Verschlusskappe) in das Röhrchen mit der gelben Verschlusskappe um zu neutralisieren.
 - Hinweis: **Vollblut-Proben ändern die Farbe der Lösung von grünlich auf dunkelrot.**
10. Reinigen Sie die DNA unter Verwendung gängiger DNA-Extraktionsprodukte (im Falle von *GINA 500 + DNA purification*: Machery Nagel Nucleo Spin-Reagenzien sind im Kit enthalten. Andernfalls: folgen Sie den Anweisungen des Herstellers der DNA-Extraktionskits und überspringen Sie die Schritte 11 - 17).
11. Platzieren Sie für jede Probe eine Filtersäule (*Column*) in ein Sammelröhrchen (*Collection Tube*) und markieren Sie dieses. Übertragen Sie die ganze GINA-Lösung (600 bis 650µL) in die Filtersäule (*Column*). Entsorgen Sie das Tube mit dem gelben Verschluss.
12. Zentrifugieren Sie für 1 Minute zwischen 9000 und 11000g. Entfernen Sie die Filtersäule (*Column*), dekantieren Sie die Flüssigkeit im Sammelröhrchen (*Collection Tube*) und setzen Sie die Filtersäule (*Column*) erneut ein.
13. Geben Sie 500µL *Wash Buffer BW* zu und zentrifugieren Sie 1 Minute zwischen 9000 und 11000g. Entfernen Sie die Filtersäule (*Column*), dekantieren Sie die Flüssigkeit im Sammelröhrchen (*Collection Tube*) und setzen Sie die Filtersäule (*Column*) erneut ein.
14. Fügen Sie 600µL *Wash Buffer B5* hinzu und zentrifugieren Sie 1 Minute zwischen 9000 und 11000g. Entfernen Sie die Filtersäule (*Column*), dekantieren Sie die Flüssigkeit im Sammelröhrchen (*Collection Tube*) und setzen Sie die Filtersäule (*Column*) erneut ein.
15. Zentrifugieren Sie für 1 Minute zwischen 9000 und 11000g, um die Silikamembran zu trocknen. Überprüfen Sie, ob Flüssigkeit am unteren Ende der Filtersäule verblieben ist. Wenn ja, diesen Schritt wiederholen.
16. Geben Sie die Filtersäule (*Column*) in ein Elutionsröhrchen (*Elution Tube*) und markieren Sie dieses. Geben Sie 150µL *Elution Buffer BE* zu. Inkubieren Sie bei Raumtemperatur für 1 Minute. Zentrifugieren Sie für 1 Minute zwischen 9000 und 11000g. Überprüfen Sie das Elutionsvolumen. Falls das Elutionsvolumen zu niedrig ist, den Zentrifugationsschritt wiederholen. Entsorgen Sie die Filtersäule (*Column*).
17. Öffnen Sie das Elutionsröhrchen (*Elution Tube*) und inkubieren Sie für 3 Minuten bei 100°C im Heizblock.
18. Die gesammelte Flüssigkeit mit der DNA (Eluat), kann für PCR-basierte Anwendungen verwendet oder bei -20 ° C für die spätere Verarbeitung gelagert werden. Vor der Verwendung muss das Eluat kräftig **gevortext** werden.



Leistungsdaten

Rate der Wiederfindung von Pathogenen: Lebende Mikroorganismen (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*) wurden in EDTA-Vollblutproben von gesunden Freiwilligen gespikt. Diese Proben wurden homogenisiert (gevortext). Leeres Wachstumsmedium wurde als negative Kontrolle versetzt. Der erste Schritt des GINA 500-Protokolls wurde ausgeführt (*LE solution* + Zentrifugation). Die resultierenden Pellets wurden in 100µL EDTA-Vollblut resuspendiert und auf LB-Agar ausplattiert. Nach der Zentrifugation wurden ebenfalls 100µL des Überstandes ausplattiert, um die Anzahl der lebenden Mikroorganismen zu bestimmen, die nicht im Pellet gebunden waren (= Verlust). Die Kolonien wurden gezählt und nach 24 bis 48 Stunden Inkubation dokumentiert.



Die Wiederfindungsrate liegt zwischen 88% (*Klebsiella pneumoniae*) und 98% (*Enterococcus faecalis*).

Entsorgung

Patientenprobenbehältnisse (z. B. EDTA-Röhrchen) und LE-Lösungsröhrchen (gelbe Verschlusskappe) enthalten potenziell infektiöses Material und müssen entsprechend den Vorschriften Ihrer Organisation zur Entsorgung von infektiösem Material entsorgt werden.

Alle anderen verwendeten Einmalartikel (Tubes, Filterspitzen ...) können ohne besondere Entsorgungsprozeduren entsorgt werden. Es muss die übliche Sorgfalt für potentiell infektiöses Material angewandt werden.

Troubleshooting

Bei Problemen mit dem Produkt kontaktieren Sie bitte:



Cube Dx GmbH
Westbahnstraße 55, 4300 St. Valentin, Austria
Kontaktinformation: www.cubedx.com

