

Svibanj 2021.

Upute za uporabu (priručnik) za komplet QIASymphony[®] PAXgene[®] Blood ccfDNA Kit (CE-IVD)



192

Verzija 1

IVD

Za in vitro dijagnostičku uporabu

CE

REF

768566



PreAnalytiX GmbH, Feldbachstrasse, CH - 8634
Hombrechtikon, Švicarska

R1 **MAT**

1123518HR

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

Zaštitni znakovi: PAXgene®, PreAnalytiX® (PreAnalytiX GmbH); QIAGEN®, QIAcube®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Corning®, Falcon® (Corning, Inc.); Eppendorf® (Eppendorf AG); SpeedVac® (Thermo Fisher Scientific ili podružnice tog društva). Registrirani nazivi, zaštitni znakovi itd. korišteni u ovom dokumentu, čak i ako nisu specifično označeni kao takvi, ne smiju se smatrati zakonski nezaštićenim.

Ugovor o ograničenoj licenciji za komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit

Uporabom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik proizvoda pristaje na sljedeće uvjete:

1. Proizvod se može upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim priručnikom i namijenjen je samo za uporabu s komponentama koje su sadržane na panelu. Društvo PreAnalytiX® ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za uporabu ili spajanje komponentata ovog panela s bilo kojom komponentom koja nije sadržana na ovom panelu, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovom priručniku i drugim protokolima dostupnima na web-mjestima www.qiagen.com i www.PreAnalytiX.com.
2. Osim izričito navedenih licencija, društvo PreAnalytiX ne jamči da ovaj panel i/ili njegova uporaba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj panel i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, prerađivati niti preprodavati.
4. Društvo PreAnalytiX odriče se svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog panela potvrđuju da neće dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje. Društvo PreAnalytiX može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenciji na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenciji ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s panelom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na web-mjestima www.qiagen.com i www.PreAnalytiX.com.

HB-2666-001 1123518 © 2021 PreAnalytiX GmbH, sva prava pridržana.

Sadržaj

Namjena	5
Predviđeni korisnik	5
Opis i načelo.....	6
Sažetak i objašnjenje	6
Načela postupka.....	7
Uključeni materijali	9
Sadržaj kompleta	9
Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni.....	10
Oprema	10
Upozorenja i mjere opreza	11
Sigurnosne informacije.....	11
Mjere opreza	12
Pohrana i rukovanje reagensima	14
Komponente kompleta	14
Uzimanje i priprema ispitaka	16
Postupak	20
Pregled: automatsko pročišćavanje ccfDNA na instrumentu QIASymphony SP.....	20
Pregled protokola	25
Protokol: automatsko pročišćavanje ccfDNA na instrumentu QIASymphony SP.....	28
Kontrola kvalitete	31
Ograničenja	31
Vodič za rješavanje problema	32
Simboli.....	34

Dodatak: Kvantifikacija ccfDNA	36
Informacije za narudžbu	37
Povijest revizija dokumenta	39

Namjena

Komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) za uporabu s instrumentom QIASymphony SP namijenjen je za automatiziranu izolaciju i pročišćavanje slobodne cirkulirajuće DNK (circulating cell-free DNA, ccfDNA) iz plazme dobivene iz ljudske venske pune krvi prikupljene u epruvetu PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD).

Komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) rabi tehnologiju magnetskih čestica za automatiziranu izolaciju i pročišćavanje ccfDNA iz ljudske plazme.

Komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) namijenjen je in vitro dijagnostičkoj uporabi te da ga upotrebljavaju profesionalni korisnici, kao što su tehničari i liječnici osposobljeni za molekularno-biološke tehnike.

Predviđeni korisnik

Ovaj komplet namijenjen je za profesionalnu uporabu.

Proizvod smije upotrebljavati samo osoblje koje je posebno obučeno i osposobljeno za molekularno-biološke tehnike i koje je upoznato s ovom tehnologijom.

Opis i načelo

Sažetak i objašnjenje

Slobodna cirkulirajuća DNK (circulating cell-free DNA, ccfDNA) prisutna je u plazmi obično u obliku kratkih fragmenata (<1000 bp). Koncentracija ccfDNA u plazmi obično je niska (u rasponu od 1 do 100 ng/ml) i u velikoj se mjeri razlikuje među pojedincima. Epruveta PreAnalytiX PAXgene Blood ccfDNA Tube s oznakom CE (CE-IVD) u kombinaciji s kompletom QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) sačinjava standardizirani tijek rada za prikupljanje, pohranu i prijevoz krvi, stabilizaciju DNK u zatvorenoj epruveti te naknadnu izolaciju i pročišćavanje ccfDNA iz ljudske plazme s pomoću instrumenta QIAGEN® QIASymphony SP.

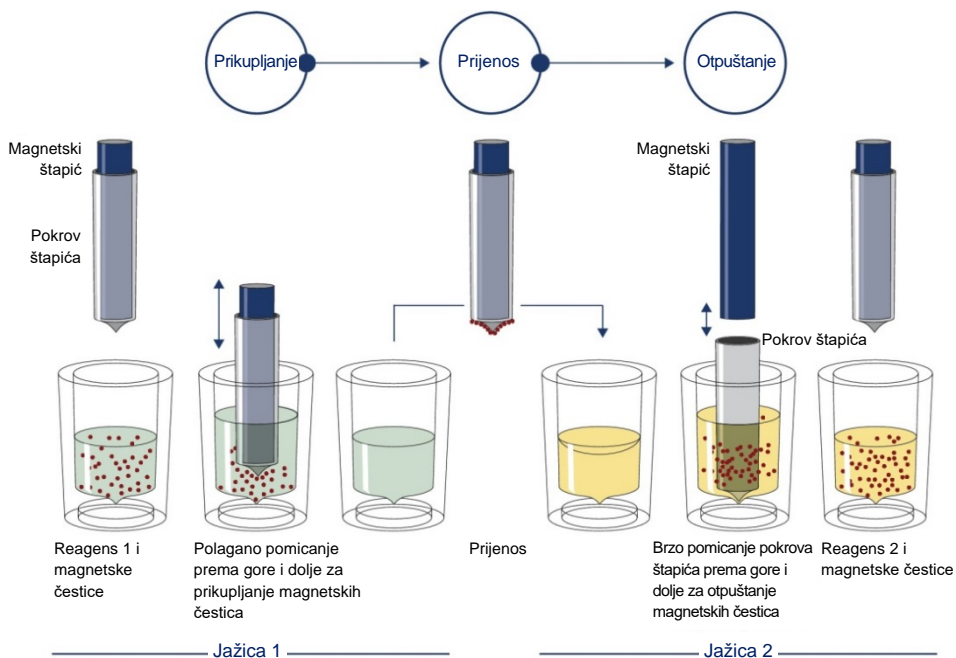
Dostupni su protokoli instrumenta QIASymphony SP za ekstrakciju ccfDNA iz 2,4 i 4,8 ml plazme dobivene dvostrukim centrifugiranjem iz krvi prikupljene u epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD). Plazma se prenosi i obrađuje u sekundarnoj epruveti na instrumentu QIASymphony SP.

Alternativno, protokoli za rukovanje primarnom epruvetom na instrumentu QIASymphony SP dostupni su za ulazni volumen plazme od 2,4 i 4 ml. U tom slučaju nema potrebe za drugim korakom centrifugiranja ili prijenosom plazme u sekundarnu epruvetu.

Tehnologija magnetskih čestica kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit omogućuje pročišćavanje visokokvalitetne ccfDNA bez proteina, nukleaza i drugih nečistoća. Na instrumentu QIASymphony SP izvode se svi koraci postupka pročišćavanja. U jednom izvođenju obrađuje se do 96 uzoraka, u serijama od 24. Za izolaciju genomske DNK (genomic DNA, gDNA) iz frakcije nukleiranih stanica krvi prikupljene u epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) na instrumentu QIASymphony SP pogledajte informacije navedene u uputama za uporabu epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) (www.PreAnalytiX.com).

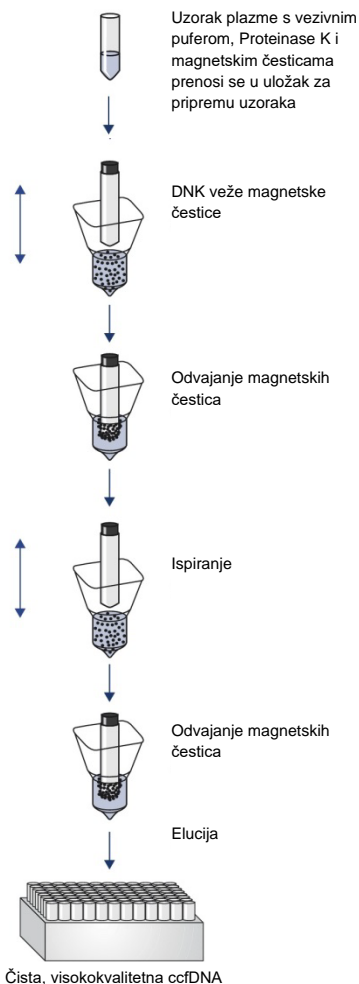
Načela postupka

Tehnologija instrumenta QIASymphony SP kombinira brzinu i učinkovitost pročišćavanja nukleinske kiseline na bazi anionske izmjene s praktičnim postupanjem s magnetskim česticama (slika 1). Postupak pročišćavanja osmišljen je kako bi se zajamčilo sigurno i ponovljivo rukovanje potencijalno zaraznim uzorcima, a sastoji se od 3 koraka: vezanje, ispiranje i elucija (slika 2). Korisnici mogu odabrati različite ulazne volumene uzorka.



Slika 1. Shematski dijagram načela instrumenta QIASymphony SP. Instrument QIASymphony SP obrađuje uzorak koji sadržava magnetske čestice na sljedeći način: magnetski štapić zaštićen pokrovom štapića ulazi u jažicu s uzorkom i privlači magnetske čestice. Pokrov magnetskog štapića postavlja se iznad druge jažice i magnetske se čestice otpuštaju. Tijekom obrade uzorka ti se koraci ponavljaju nekoliko puta. Instrument QIASymphony SP upotrebljava magnetsku glavu koja sadrži 24 magnetska štapića te tako može istovremeno obrađivati do 24 uzorka.

QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit



Slika 2. Koraci za ekstrakciju ccfDNA s pomoću kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD). Fragmenti ccfDNA izoliraju se iz plazme dobivene iz ljudske venske pune krvi prikupljene u epruvetu PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD). Tijekom prvog koraka obrade, Proteinase K razgrađuje proteine u plazmi, a ccfDNA se veže na površinu magnetskih čestica. Tri koraka ispiranja jamče uklanjanje svih kontaminanata. Konačno, ccfDNA se eluira iz magnetskih čestica i spremna je za uporabu u postupcima daljnje obrade.

Uključeni materijali

Sadržaj kompleta

Skraćena	Naziv	Količina	Aktivni sastojci	Koncentracija [%]**
RC	Reagent cartridge (Uložak reagensa)*†	2	neionski deterđent magnetske čestice za izmjenu aniona NaOH etanol	≥ 0,5 – < 10 [w/w] Nije primjenjivo ≥ 0,05 – < 0,1 [w/w] ≥ 70 – < 90 [v/v]
PROTK	Proteinase K (Proteinaza K)†	5 x 10 ml	Proteinase K	≥ 1 – < 3 % [w/w]
PL	Piercing lid (Poklopac za bušenje)	2	—	Nije primjenjivo
RSS	Reuse Seal Set (Komplet za zatvaranje za ponovnu uporabu)‡	2	—	Nije primjenjivo
	Elution Microtubes CL, racked (Mikropruvete za eluciju CL, na stalku)§	2	—	Nije primjenjivo
	Caps for Elution Microtubes (Čepovi za mikropruvete za eluciju)§	1 x (55 x 8)	—	Nije primjenjivo
	Upute za uporabu (priručnik)	1	—	Nije primjenjivo
	PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool	1	—	Nije primjenjivo

* Sadržava natrijev azid kao konzervans.

† Popis simbola i definicija potražite na stranici 34.

‡ Reuse Seal Set sadržava 8 stripova za zatvaranje radi ponovne uporabe.

§ Proizvod je također dostupan zasebno, pogledajte Informacije za narudžbu.

** Maksimalna koncentracija u jednoj jažici.

Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

Kada radite s kemikalijama i biološkim uzorcima, uvijek se pridržavajte općih mjera opreza i nosite prikladnu laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale u skladu s pravilima i postupcima vaše ustanove. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Provjerite jesu li instrumenti pregledani i kalibrirani prema preporuci proizvođača.

- Sample Prep Cartridges, 8-well (QIAGEN, kat. br. 997002)
- 8-Rod Covers (QIAGEN, kat. br. 997004)
- Filter-Tips, 200 µl i 1500 µl (QIAGEN, kat. br. 990332 i 997024)
- Tip Disposal Bags (QIAGEN, kat. br. 9013395)
- PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) (PreAnalytiX, kat. br. 768165)
- Epruvete za uzorke. Za informacije o kompatibilnim formatima primarnih i sekundarnih epruveta pogledajte popis laboratorijskih proizvoda koji možete pronaći na kartici Product Resources (Resursi za proizvod) stranice proizvoda na web-mjestu **www.qiagen.com**.
- Za informacije o kompatibilnim formatima epruveta za eluciju pogledajte popis laboratorijskih proizvoda koji možete pronaći na kartici Product Resources (Resursi za proizvod) stranice proizvoda na web-mjestu **www.qiagen.com**.

Oprema*

- Pipeta (5 ml)
- QIASymphony SP instrument (QIAGEN, kat. br. 9001297)

* Prije uporabe provjerite jesu li instrumenti pregledani i kalibrirani prema preporuci proizvođača.

Upozorenja i mjere opreza

Za in vitro dijagnostičku uporabu

Prije uporabe kompleta pažljivo pročitajte sve upute.

Kupci u Europskoj uniji moraju imati na umu da ozbiljne štetne događaje koji su nastali u vezi s proizvodom treba prijaviti proizvođaču ili nadležnom tijelu u državi članici u kojoj se nalazi korisnik i/ili pacijent.

Sigurnosne informacije

Kada radite s kemikalijama i biološkim uzorcima, uvijek se pridržavajte općih mjera opreza i nosite prikladnu laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale u skladu s pravilima i postupcima vaše ustanove. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS). Oni su dostupni na mreži u PDF formatu na web-mjestu www.qiagen.com/safety. Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati sigurnosno-tehnički list (Safety Data Sheet, SDS) za svaki komplet i komponentu kompleta društva PreAnalytiX.

- Sve kemikalije i biološki materijali potencijalno su opasni. Ispitci i uzorci potencijalno su infektivni i s njima je potrebno postupati kao s biološki opasnim materijalom.
- Bacite otpad od uzoraka i ispitivanja u skladu s lokalnim sigurnosnim propisima.

Mjere opreza

Puferi u ulošku reagensa (reagent cartridge, RC) sadržavaju natrijev azid. Ako se puferi iz kompleta proliju, očistite ih odgovarajućim laboratorijskim deterdžentom i vodom. Ako prolivena tekućina sadržava potencijalno infektivne agense, očistite zahvaćeno područje najprije laboratorijskim deterdžentom i vodom, a zatim 1 %-tnim (v/v) natrijevim hipokloritom (izbjeljivačem).

Sljedeće izjave o opasnosti i mjerama opreza odnose se na komponente kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit.

MBS3

Sadržava: natrijev azid. Upozorenje! Može biti štetno ako se proguta. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.

Proteinase K



Sadržava: Proteinase K. Opasnost! Uzrokuje blago nadraživanje kože. Ako se udiše može izazvati simptome alergije ili astme ili poteškoće s disanjem. Izbjegavati udisanje prašine/dima/plina/magle/pare/aerosola. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. Nositi sredstva za zaštitu dišnog sustava. U slučaju izloženosti ili sumnje na izloženost: nazvati centar za kontrolu otrovanja ili liječnika. Premjestiti unesrećenog na svjež zrak, umiriti ga i postaviti u položaj koji olakšava disanje.

QSE2



Sadržava: natrijev hidroksid. Opasnost! Uzrokuje teške opekline kože i ozljede oka. Odložiti sadržaj/spremnik u odobreno postrojenje za odlaganje otpada. **U slučaju dodira s očima:** oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. **U slučaju dodira s kožom (ili kosom):** odmah ukloniti/skinuti svu zagađenu odjeću. Isprati kožu vodom/tuširanjem. Odmah nazvati centar za kontrolu otrovanja ili liječnika. Skladištiti pod ključem. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.

QSW9



Sadržava: etanol. Opasnost! Lako zapaljiva tekućina i para. Uzrokuje jako nadraživanje oka. Čuvati odvojeno od topline/iskre/otvorenog plamena/vrućih površina. Ne pušiti. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.

Pohrana i rukovanje reagensima

Komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) treba se pohraniti u uspravnom položaju na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C). Magnetske čestice u ulošcima reagensa (reagent cartridge, RC) ostaju aktivne prilikom pohrane unutar navedenog temperaturnog raspona.

Napomena: datum isteka roka trajanja kompleta naveden je na naljepnici na kutiji kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD). Taj se datum isteka roka trajanja odnosi na uložak reagensa.

Nemojte upotrebljavati komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) nakon isteka roka trajanja.

Komponente kompleta

Komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) sadržava otopinu Proteinase K spremnu za uporabu koja se može pohraniti na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C).

Nemojte pohraniti uloške reagensa (reagent cartridge, RC) na temperaturama nižima od 15 °C.

Otvoreni ulošci reagensa (reagent cartridge, RC) kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) mogu se pohraniti na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) do 4 tjedna, što omogućuje isplativu ponovnu uporabu reagensa i fleksibilniju obradu uzoraka. Ako je uložak reagensa (reagent cartridge, RC) djelomično iskorišten, zamijenite poklopac spremnika s magnetskim česticama i zatvorite uložak reagensa (reagent cartridge, RC) stripovima za zatvaranje radi ponovne uporabe isporučenima u kompletu odmah nakon dovršetka protoka kako bi se spriječilo isparavanje.

Kako bi se spriječilo isparavanje reagensa, uložak reagensa (reagent cartridge, RC) smije biti otvoren maksimalno 15 sati (uključujući vrijeme izvođenja postupaka) na maksimalnoj temperaturi okoline od 32 °C. Neispravna pohrana komponenti kompleta može dovesti do ubrzanog starenja pufera.

Obrada serija s malim brojem uzoraka (< 24) produžit će vrijeme koliko je uložak reagensa (Reagent Cartridge, RC) otvoren i dovest će do povećanja potrebnih volumena pufera, što bi moglo smanjiti ukupan broj mogućih priprema uzoraka po ulošku.

Izbjegavajte izlaganje uložaka reagensa (Reagent Cartridge, RC) UV svjetlosti (npr. koja se upotrebljava za dekontaminaciju) jer izlaganje može ubrzati starenje uložaka reagensa (Reagent Cartridge, RC) i pufera.

Potrebno je paziti na rokove trajanja i uvjete pohrane ispisane na kutiji i naljepnicama svih komponenata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok ili koje su bile nepravilno pohranjene.

Uzimanje i priprema ispitaka

Postupak pročišćavanja optimiran je za uporabu s plazmom dobivenom iz krvi prikupljene u epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD). Informacije o prikupljanju krvi, rukovanju epruvetama i pripremi plazme potražite u uputama za uporabu epruveta PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) koje možete pronaći na karticama Product Resources (Resursi za proizvod) stranica odgovarajućih proizvoda na web-mjestima **www.qiagen.com** i **www.PreAnalytiX.com**.

Priprema plazme može se obavljati primjenom (A) standardnog protokola dvostrukog centrifugiranja ili (B) rukovanjem primarnom epruvetom: izravna obrada jednom centrifugiranih epruveta PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) na instrumentu QIASymphony SP.

A) Priprema plazme iz krvi za standardne protokole

1. Centrifugirajte epruvetu PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) u trajanju od 15 minuta pri 1600 – 3000 x g (prvo centrifugiranje) i 10 minuta pri 1600 – 3000 x g (drugo centrifugiranje) primjenom ravnomjerno opterećene centrifuge s njišućim vjedrima. Ako više preferirate kočenje, preporučuje se primjena kočenja srednje razine koje je odobreno za vaš specifičan tijek rada.

Napomena: za najbolje radne značajke uzoraka pohranjenih u hladnjaku prije centrifugiranja, ostavite epruvete da prije obrade dosegnu sobnu temperaturu.

2. Pipetirajte plazmu u epruvetu za centrifugiranje s konusnim dnom i volumenom od 15 ml (nije isporučena), pazeći pritom da ne ometate frakciju nukleiranih stanica.
3. Centrifugirajte epruvetu za centrifugiranje s konusnim dnom od 15 ml na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) u trajanju od 15 minuta pri 1600 – 3000 x g (prvo centrifugiranje) i 10 minuta pri 1600 – 3000 x g (drugo centrifugiranje) primjenom ravnomjerno opterećene centrifuge.

Napomena: ne prelazite maksimalnu brzinu centrifugiranja koju je preporučio proizvođač sekundarne epruvete.

4. Pipetirajte željeni volumen plazme (pogledajte odjeljak „Volumen uzorka“, stranica 20) u polistirensku epruvetu sa zaobljenim dnom od 14 ml, veličine 17 x 100 mm, pazeći pritom da ne ometate preostali talog krvnih stanica, ako je prisutan.
5. Prenesite epruvetu sa zaobljenim dnom koja sadržava uzorak plazme u nosač epruveta i postavite nosač epruveta u ladicu za unos uzoraka na instrumentu QIASymphony SP.

Napomena: za maksimalan prinos ccfDNA obradite maksimalni volumen dostupne plazme.

Napomena: spriječite stvaranje pjene u uzorcima plazme ili na njima. Pjena ili mjehurići zraka na uzorcima mogu dovesti do pipetiranja pogrešnog volumena uzorka.

Napomena: nakon prikupljanja krvi i centrifugiranja epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tubes (IVD) stabiliziraju ccfDNA (profil ccfDNA) u plazmi na temperaturi od 2 – 8 °C do 7 dana prije obrade plazme. Za dulju pohranu preporučujemo zamrzavanje alikvota.

Napomena: kada se upotrebljavaju prethodno pohranjeni uzorci plazme (npr. pohranjeni na 2 – 8 °C ili zamrznuti na -20 ili -70 °C/-80 °C), prije pokretanja postupka potrebno ih je izjednačiti sa sobnom temperaturom (15 – 25 °C).

B) Priprema plazme iz krvi za rukovanje primarnom epruvetom na instrumentu QIASymphony SP

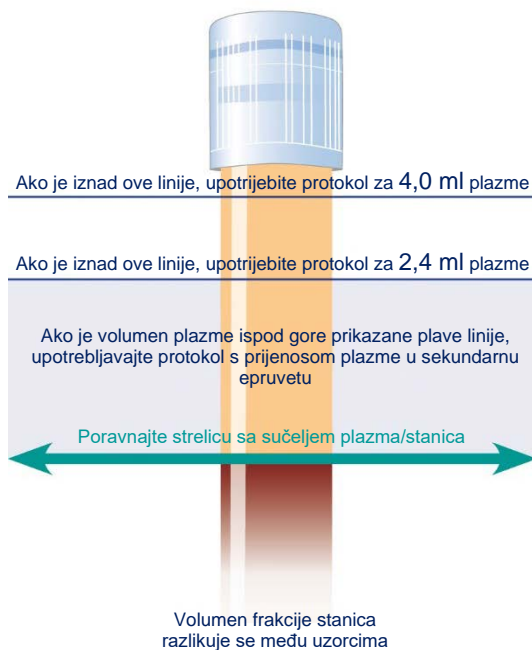
1. Centrifugirajte epruvetu PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) u trajanju od 15 minuta pri 3000 x g primjenom ravnomjerno opterećene centrifuge s njišućim vjedrima. Ako više preferirate kočenje, preporučuje se primjena kočenja srednje razine koje je odobreno za vaš specifičan tijek rada.

Napomena: za najbolje radne značajke uzoraka pohranjenih u hladnjaku prije centrifugiranja, ostavite epruvete da prije obrade dosegnu sobnu temperaturu.

2. Kvantificirajte volumen plazme u svakoj epruveti nakon uklanjanja iz vjedra centrifuge s pomoću alata PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool isporučenog u kompletu (slika 3). Nakon uklanjanja epruvete iz centrifuge, plavozelena strelica na alatu poravnata je sa sučeljem plazma/stanica. Plave linije označavaju je li razina plazme dovoljna za protokol rukovanja primarnom epruvetom od 2,4 ili 4,0 ml. Za protokol od 2,4 ml potrebna je minimalna visina kolone za plazmu u iznosu od 2,3 cm, a za protokol od 4,0 ml potrebna je minimalna visina kolone od 3,4 cm.



Optimalni protokol za obradu epruveta
PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD)
odredite izravno na
instrumentu QIASymphony SP



Slika 3. Određivanje volumena plazme s pomoću alata PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool (služi samo za ilustraciju; nemojte ispisivati jer se stvarna veličina može razlikovati – nije za uporabu s uzorcima).

Napomena: u slučaju da nije došlo do jasne frakcije plazme ili stanica ili su se faze slučajno izmiješale nakon uklanjanja iz centrifuge, centrifugiranje je potrebno ponoviti.

3. Uklonite čep Hemogard s epruveta PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) prije postavljanja na instrument QIASymphony SP radi izravne ekstrakcije ccfDNA.

Napomena: pažljivo uklonite čep epruvete i pažljivo rukujte otvorenim epruvetama kako biste smanjili mogući rizik od prolijevanja uzorka, unakrsne kontaminacije između epruveta i izlaganja krvi.

4. Otvorene epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) koje sadržavaju dovoljnu količinu plazme stavite na nosač epruveta te postavite nosač epruveta u ladicu za unos uzoraka na instrumentu QIASymphony SP.

C) Zamrzavanje i odmrzavanje uzoraka plazme obrađenih u epruveti PAXgene Blood ccfDNA Tube

1. Za zamrzavanje prenesite plazmu u prikladne epruvete (npr. kriobochice) postavljene na odgovarajući stalak.
2. Zamrznite i pohranite plazmu na -20 °C. Za pohranu na temperaturi nižoj od -20 °C prvo zamrznite uzorke plazme na -20 °C na najmanje 24 sata, a zatim ih prenesite na temperaturu od -70 ili -80 °C.
3. Odmrznite plazmu dok ne dosegne sobnu temperaturu (15 – 25 °C).

Napomena: nemojte odmrzavati na niskim temperaturama (npr. 4 °C).

4. Ako se u plazmi stvaraju krioprecipitati, nakon odmrzavanja vrtložno miješajte epruvetu 30 sekundi i upotrijebite uzorak za postupak izolacije ccfDNA na instrumentu QIASymphony SP bez daljnje obrade.

Napomena: ne preporučuje se centrifugirati plazmu za uklanjanje krioprecipitata jer oni mogu sadržavati ccfDNA.

Napomena: kako bi se spriječilo stvaranje krioprecipitata, plazma se može odmrzavati na 30 °C u trajanju od 30 minuta umjesto na sobnoj temperaturi.

Postupak

Pregled: automatsko pročišćavanje ccfDNA na instrumentu QIASymphony SP

Automatska priprema uzorka na instrumentu QIASymphony SP jednostavna je i praktična. U zasebne ladice se odvajaju uzorci, reagensi i potrošni materijali te eluati. Prije izvođenja postupka jednostavno postavite uzorke, reagense u posebnim ulošcima i potrošne materijale već postavljene na stalke u odgovarajuću ladicu. Pokrenite protokol i nakon obrade izvadite pročišćenu ccfDNA iz ladice „Eluate” (Eluat). Upute za rad potražite u korisničkim priručnicima isporučenim s instrumentom.

Napomena: neobavezno održavanje nije neophodno za rad instrumenta, ali se preporučuje radi smanjenja rizika od kontaminacije.

Volumen uzorka

Kako biste se uvjerali da je instrument prenio uzorke uobičajenog tijeka rada od 2,4 ml (protokol PAXcircDNA_2400) i 4,8 ml (protokol PAXcircDNA_4800), potreban je prazan volumen od 0,4 odnosno 0,5 ml, što znači da se mora osigurati unos uzorka od minimalno 2,8 i 5,3 ml. Ako je dostupan volumen plazme manji od 2,8 ili 5,3 ml, način **Less Sample** (Manja količina uzorka) kao sastavna funkcija protokola automatski omogućava prijenos volumena plazme manjih od navedenog. U tom slučaju instrument prenosi manju količinu uzorka, a preneseni volumen bilježi se u datoteku rezultata. Osim toga, odgovarajući uzorci označavaju se kao nejasni (kod pogreške 140043, način **Enable Less Sample** (Omogući manju količinu uzorka)). Minimalni ulazni volumeni plazme za omogućavanje načina **Less Sample** (Manja količina uzorka) iznose 1,6 i 4,1 ml. Ako se isporuči manji volumen uzorka, uzorci se neće obraditi i bit će označeni kao nevažeći. Za tijek rada rukovanja primarnom epruvetom odgovarajući volumen uzorka osigurava se primjenom alata PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool isporučenog u kompletu (opisanog u odjeljku „Priprema materijala uzorka” na stranici 24).

Postavljanje uložaka reagensa (reagent cartridge, RC) u ladicu „Reagents and Consumables” (Reagens i potrošni materijali)

Reagensi za pročišćavanje ccfDNA nalaze se u inovativnom ulošku reagensa (reagent cartridge, RC) (slika 4). Svaki spremnik uloška reagensa (Reagent Cartridge, RC) sadržava određeni reagens, kao što su magnetske čestice, vezivni pufer, pufer za ispiranje ili pufer za eluciju. Djelomično iskorišteni ulošci reagensa (Reagent Cartridge, RC) mogu se zatvoriti stripovima za zatvaranje radi ponovne uporabe, čime se sprječava nastanak otpada od ostataka reagensa na kraju postupka pročišćavanja.



Slika 4. Uložak reagensa (reagent cartridge, RC) QIASymphony. Uložak reagensa (reagent cartridge, RC) sadržava sve reagense potrebne za izvođenje protokola.

Prije početka postupka provjerite jesu li magnetske čestice potpuno resuspendirane. Uklonite spremnik s magnetskim česticama iz okvira uloška reagensa (Reagent Cartridge, RC), snažno vrtložno miješajte barem 3 minute, a zatim ga vratite u okvir uloška reagensa (Reagent Cartridge, RC) prije prve uporabe.

Napomena: boja magnetskih čestica može se promijeniti. To nema nikakav utjecaj na radne značajke.

Postavite uložak reagensa (RC) u odgovarajući držač za RC. Prije prve uporabe uložka reagensa (RC) na njega stavite poklopac za bušenje (slika 4).

Napomena: poklopac za bušenje oštar je. Budite pažljivi kada ga stavljate na uložak reagensa (RC). Provjerite jeste li stavili poklopac za bušenje na uložak reagensa (RC) u ispravnom smjeru.

Nakon uklanjanja poklopca spremnika s magnetskim česticama uložak reagensa (RC) postavlja se u ladicu „Reagents and Consumables” (Reagensi i potrošni materijali).

Djelomično iskorišteni ulošci reagensa (RC) mogu se pohraniti dok ponovno ne budu potrebni (pogledajte „Pohrana i rukovanje reagensima” na stranici 14).

Napomena: mora se dodati Proteinase K (pogledajte „Postupci koje treba napraviti prije započinjanja” na stranici 26).

Napomena: pazite da se ulošci reagensa (RC), spremnici s magnetskim česticama i bočice s Proteinase K ne upotrebljavaju s različitim serijama kompleta.

Postavljanje plastičnog pribora u ladicu „Reagents and Consumables” (Reagensi i potrošni materijali)

Ulošci za pripremu uzoraka, pokrovi 8-Rod Covers (oba proizvoda unaprijed postavljena u kutije jedinica) i jednokratni vršci s filtrom (vršci od 200 µl na plavim stalcima, vršci od 1500 µl na crnim stalcima) stavljaju se u ladicu „Reagents and Consumables” (Reagensi i potrošni materijali).

Napomena: pobrinite se da su poklopci kutija jedinica uklonjeni prije stavljanja kutija jedinica u ladicu „Reagents and Consumables” (Reagensi i potrošni materijali).

Napomena: vršci imaju filtre radi sprječavanja unakrsne kontaminacije.

U utore za stalke s vršcima na radnoj površini instrumenta QIASymphony SP možete postaviti bilo koju vrstu stalka s vršcima. Instrument QIASymphony SP prepoznat će vrstu postavljenih vršaka tijekom očitavanja zaliha.

Napomena: nemojte ponovno puniti stalke s vršcima ili kutije jedinica za uloške za pripremu uzoraka ili pokrove 8-Rod Covers prije pokretanja drugog protokola. Na instrumentu QIASymphony SP mogu se upotrebljavati djelomično iskorišteni stalci i kutije jedinica s vršcima.

Za informacije o naručivanju plastičnog pribora pogledajte stranicu 37.

Punjenje ladice „Waste” (Otpad)

Ulošci za pripremu uzoraka i pokrovi 8-Rod Covers koji se upotrebljavaju tijekom izvođenja postupka postavljaju se u prazne kutije jedinica u ladici „Waste” (Otpad). Provjerite nalazi li se u ladici „Waste” (Otpad) dovoljno praznih kutija jedinica za plastični otpad nastao tijekom izvođenja protokola.

Napomena: pobrinite se da su poklopci kutija jedinica uklonjeni prije stavljanja kutija jedinica u ladicu „Waste” (Otpad). Ako upotrebljavate kutije za pokrove 8-Rod Covers za prikupljanje iskorištenih uložaka za pripremu uzoraka i pokrove 8-Rod Covers, provjerite je li odstojnik kutije uklonjen.

S prednje strane ladice „Waste” (Otpad) mora se pričvrstiti vrećica za iskorištene vrške s filtrom.

Napomena: sustav ne provjerava prisutnost vrećice za odlaganje vršaka. Pobrinite se da je vrećica za odlaganje vršaka ispravno pričvršćena prije pokretanja protokola. Dodatne informacije potražite u korisničkim priručnicima isporučenim s instrumentom. Ispraznite vrećicu s vršcima nakon obrade maksimalno 96 uzoraka kako biste spriječili zaglavljivanje vršaka.

U spremniku za otpad prikuplja se tekući otpad nastao tijekom postupka pročišćavanja. Ladicu „Waste” (Otpad) možete zatvoriti samo kada je spremnik za tekući otpad na svojem mjestu. Uklonite tekući otpad u skladu s lokalnim sigurnosnim propisima i propisima o zaštiti okoliša. Nemojte autoklavirati napunjenu bocu za otpad. Ispraznite bocu za otpad nakon obrade maksimalno 96 uzoraka.

Punjenje ladice „Eluate” (Eluat)

Postavite potreban stalak za eluciju u ladicu „Eluate” (Eluat). S obzirom na to da dugoročna pohrana eluata u ladici „Eluate” (Eluat) može dovesti do isparavanja ili kondenzacije, mora se upotrebljavati položaj za hlađenje. Upotrebljavajte samo „Elution slot 1” (Utor za eluciju 1) s odgovarajućim adapterom za hlađenje.

Odabrani volumen elucije (µl)*	Početni volumen elucije (µl)†
60	75

* To je minimalni dostupni volumen eluata u epruveti za konačnu eluciju za stalak QIAGEN EMT rack (kat. br. 19588) i epruvete 1.5 ml Sarstedt screw cap tubes (kat. br. 72.607). U pojedinim slučajevima volumen konačnog eluata za pojedinačne uzorke može biti i do 5 µl manji.

† Početni volumen pufera za eluciju potreban kako bi se osiguralo da je stvarni volumen eluata jednak odabranom volumenu.

Očitavanje zaliha

Prije pokretanja postupka instrument provjerava je li u odgovarajuće ladice postavljena dovoljna količina potrošnog materijala za seriju/e u redu čekanja.

Priprema materijala uzorka

Pogledajte „Uzimanje i priprema ispitaka”, stranica 16.

Pohrana ccfDNA

Nakon pripreme uzoraka eluati ccfDNA mogu se pohraniti na -20 ili -80 °C. Zamrznuti eluati ne smiju se odmrzavati više od tri puta. Za najnovije informacije o stabilnosti ccfDNA u eluatima pogledajte stranicu proizvođača na web-mjestu www.qiagen.com ili www.PreAnalytiX.com.

Pregled protokola

Tablica 1. Pregled protokola

Uzorak	Obrada epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD)	Ulazni volumen uzorka (uklj. prazan volumen) (ml)	Volumen uzorka koji se upotrebljava za ekstrakciju ccfDNA (ml)	Volumen elucije (µl)	Protokol na instrumentu QI Asymphony SP	
Plazma dobivena iz ljudske venske pune krvi prikupljene u epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD)	2x centrifugiranje, prijenos plazme u sekundarnu epruvetu	2,8	2,4	60	PAXcircDNA_2400	
		5,3	4,8	60	PAXcircDNA_4800	
	1x centrifugiranje, izravna obrada na instrumentu QIAsymphony SP	U skladu s alatom za odabir		2,4	60	PAXcircDNA PrimaryTube_2400
				4,0	60	PAXcircDNA PrimaryTube_4000

Važne napomene prije započinjanja

- Kad radite s kemikalijama i biološkim uzorcima, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Za više informacija pogledajte odgovarajuće sigurnosno-tehničke listove (Safety Data Sheet, SDS).
- Obavezno se upoznajte s radom instrumenta QIAsymphony SP. Upute za rad potražite u korisničkim priručnicima isporučenim s instrumentom.
- Prije početka postupka pročitajte odjeljak „Načela postupka”.
- Obavezno se upoznajte s listom protokola i popisom laboratorijskih proizvoda (možete ih pronaći na kartici Product Resources (Resursi za proizvod) stranice proizvoda na web-mjestu www.qiagen.com).
- Nemojte snažno protresati uložak reagensa (RC); ako to učinite, može nastati pjena koja može dovesti do problema s otkrivanjem razine tekućine.

- Krv treba prikupljati u epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD; PreAnalytiX, kat. br. 768165). Informacije o prikupljanju krvi, rukovanju epruvetama i obradi plazme potražite u uputama za uporabu koje možete pronaći na kartici Product Resources (Resursi za proizvod) i kartici Resources (Resursi) stranice proizvoda na web-mjestima www.qiagen.com ili www.PreAnalytiX.com.

Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Prije početka postupka provjerite jesu li magnetske čestice potpuno resuspendirane. Prije uporabe snažno vrtložno promiješajte spremnik koji sadržava magnetske čestice u trajanju od barem 3 minute.
- Provjerite je li poklopac za bušenje postavljen na uložak reagensa (reagent cartridge, RC) i je li poklopac spremnika s magnetskim česticama uklonjen, odnosno, ako upotrebljavate djelomično iskorišteni uložak reagensa (reagent cartridge, RC), provjerite jesu li stripovi za zatvaranje radi ponovne uporabe uklonjeni.
- Proteinase K nije sadržana u ulošku reagensa (reagent cartridge, RC) nego je treba nabaviti korisnik (ladica za uzorke, utor A, položaj 1 i/ili 2). Provjerite je li dostupan odgovarajući volumen Proteinase K.

Komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) sadržava otopinu Proteinase K spremnu za uporabu. Proteinase K može se pohraniti na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C). Za pohranu tijekom duljeg vremenskog razdoblja preporučujemo čuvanje enzimskih bočica s Proteinase K na temperaturi od 2 – 8 °C.

Broj uzorka	PAXcircDNA_2400/PAXcircDNA PrimaryTube_2400*	PAXcircDNA_4800/PAXcircDNA PrimaryTube_4000*
8	1980 µl	2860 µl
24	3740 µl	6380 µl
48	6380 µl	11.660 µl [†]
96	11.660 µl [†]	23.320 µl [†]

* Za svaki uzorak potrebno je 110 µl (za 2400 µl plazme) ili 220 µl (za 4800/4000 µl plazme), plus dodatan prazan volumen od 1100 µl [(n x 110 ili 220 µl) + 1100 µl].

† Ako je potrebno više od 11.660 µl, upotrijebite drugu epruvetu (Corning, kat. br. 352051). Za drugu je epruvetu potreban dodatan prazan volumen od 1100 µl.

Napomena: epruvete koje sadržavaju Proteinase K postavljaju se na nosač epruveta. Nosač epruveta s Proteinase K mora se postaviti na pozicije 1 i 2 u utoru A ladice „Sample” (Uzorak). Preporučujemo da za Proteinase K upotrebljavate 14 ml 17 x 100 mm polystyrene, round-bottom tubes (Corning, kat. br. 352051).

- Ako su uzorci označeni crtičnim kodom, okrenite uzorke u nosaču epruveta tako da su crtični kodovi usmjereni prema čitaču crtičnih kodova s lijeve strane instrumenta QIASymphony SP.
- Za informacije o epruvetama za uzorke i minimalnim volumenima uzoraka kompatibilnima s protokolima pogledajte odgovarajući popis laboratorijskih proizvoda koji možete pronaći na kartici Product Resources (Resursi za proizvod) stranice proizvoda na web-mjestu **www.qiagen.com**.

Protokol: automatsko pročišćavanje ccfDNA na instrumentu QIASymphony SP

Detaljne informacije za svaki protokol, uključujući volumene i epruvete, navedene su na listu protokola i popisu laboratorijskih proizvoda koje možete pronaći na kartici Product Resources (Resursi za proizvod) stranice proizvoda na web-mjestu **www.qiagen.com**. Za pripremu materijala uzorka (plazma dobivena iz ljudske venske pune krvi prikupljene u epruvetu PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD)) pogledajte odjeljke „Uzimanje i priprema ispita” i „Priprema materijala uzorka” u ovom priručniku te upute za uporabu epruvete koje možete pronaći na kartici Product Resources (Resursi za proizvod) i kartici Resources (Resursi) stranice proizvoda na web-mjestima **www.qiagen.com** ili **www.PreAnalytiX.com**.

1. Zatvorite sve ladice i poklopac.
2. Uključite instrument QIASymphony SP i pričekajte da se prikaže zaslon **Sample Preparation** (Priprema uzorka) i da postupak inicijalizacije završi.
3. Sklopka za napajanje nalazi se u donjem lijevom kutu instrumenta QIASymphony SP.
4. Prijavite se u instrument.
Postavite potreban stalak za eluciju u ladicu „Eluate” (Eluat).
Nemojte stavljati pločicu s 96 jažica u „Elution slot 4” (Utor za eluciju 4). Mora se upotrebljavati „Elution slot 1” (Utor za eluciju 1) s odgovarajućim adapterom za hlađenje.
Kada upotrebljavate pločicu s 96 jažica, provjerite je li pločica ispravno okrenuta jer neispravno postavljanje može uzrokovati miješanje uzoraka u postupcima daljnje analize.
Kada upotrebljavate stalak s epruvetama Elution Microtubes CL, uklonite dno okretanjem stalka dok se dno ne odvoji.
5. Provjerite je li ladica „Waste” (Otpad) ispravno pripremljena i izvedite očitavanje zaliha u ladici „Waste” (Otpad), uključujući kanal za vrške, mjesto za postavljanje vršaka, prazan spremnik za tekući otpad i prazne kutije jedinica. Po potrebi zamijenite vrećicu za odlaganje vršaka.
6. Postavite potrebne uloške reagensa (reagent cartridge, RC) i potrošne materijale u ladicu „Reagents and Consumables” (Reagensi i potrošni materijali).

7. Izvedite očitavanje zaliha u ladici „Reagents and Consumables” (Reagensi i potrošni materijali).

8. Postavite uzorke u odgovarajući nosač uzoraka i postavite ih u ladicu „Sample” (Uzorak).

Napomena: osim uobičajene obrade koja uključuje prijenos plazme u odgovarajući nosač uzoraka (polistirenska epruveta sa zaobljenim dnom od 14 ml veličine 17 x 100 mm Falcon®), tijekom rada rukovanja primarnom epruvetom PAXgene Blood ccfDNA Tube omogućuje izravnu ekstrakciju ccfDNA iz epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube (10 ml PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD), 16 x 100 mm). Više informacija o rukovanju primarnom epruvetom potražite u listu protokola, popisu laboratorijskih proizvoda i uputama za uporabu epruvete koje možete pronaći na kartici Product Resources (Resursi za proizvod) i kartici Resources (Resursi) stranice proizvoda na web-mjestima **www.qiagen.com** ili **www.PreAnalytiX.com**.

9. Koristeći zaslon osjetljiv na dodir unesite potrebne informacije za svaku seriju uzoraka i za Proteinase K koju treba obraditi.

Unesite sljedeće informacije:

- informacije o uzorku (ovisno o stalcima s uzorcima koji se upotrebljavaju odaberite **BD #352051 FalconPP 17 x 100** ili **BD_#768165 PAXgene ccfDNA 16 x 100**)
- protokol koji će se izvoditi (kontrolni komplet za ispitivanje)
- volumen elucije i izlazni položaj.

Nakon unosa informacija o seriji status se mijenja iz **LOADED** (POSTAVLJENO) u **QUEUED** (U REDU ČEKANJA). Čim jedna serija dospije u red na čekanje, prikazuje se gumb **Run** (Pokretanje).

10. Postavite Proteinase K u odgovarajući nosač uzoraka na položaj 1 i 2 te postavite nosač u utor A u ladici „Sample” (Uzorak).

11. Definirajte Proteinase K pritiskom na gumb **IC**.

12. Pritisnite gumb **Run** (Pokretanje) kako biste pokrenuli postupak pročišćavanja.

Svi koraci obrade potpuno su automatizirani. Na kraju postupka protokola status serije mijenja se iz **RUNNING** (U TIJEKU) u **COMPLETED** (ZAVRŠENO).

13. Izvadite stalak za eluciju s pročišćenom ccfDNA iz ladice „Eluate” (Eluat). Potvrdite uklanjanje stalka za eluciju u softveru instrumenta QIASymphony SP.

14. Slobodna cirkulirajuća DNK (circulating cell-free DNA, ccfDNA) može se upotrijebiti ili pohraniti na temperaturu od -20 °C ili -80 °C do 6 mjeseci.

Društvo QIAGEN preporučuje uklanjanje pločice za eluciju iz ladice „Eluate” (Eluat) odmah nakon završetka postupka. Ovisno o temperaturi i vlažnosti, ostavljanje pločica za eluciju u instrumentu QIASymphony SP nakon završetka postupka može uzrokovati kondenzaciju ili isparavanje.

Napomena: moguća je uporaba funkcije hlađenja za izvođenje postupka preko noći na instrumentu QIASymphony SP.

Magnetske čestice se uglavnom ne prenose u eluate. U slučaju da dođe do prijenosa, magnetske čestice u eluatima neće utjecati na većinu postupaka daljnje obrade.

Ako magnetske čestice treba ukloniti prije izvođenja postupaka daljnje obrade, epruvete ili pločice s eluatima prvo treba postaviti u odgovarajući magnet pa prenijeti eluate u čistu epruvetu (pogledajte „Dodatak: Kvantifikacija ccfDNA”).

Datoteke s rezultatima generiraju se za svaku pločicu za eluciju.

15. Ako je uložak reagensa (RC) samo djelomično iskorišten, zatvorite ga priloženim stripovima za zatvaranje radi ponovne uporabe nakon završetka protokola kako biste izbjegli isparavanje.

Napomena: za više informacija o pohrani djelomično iskorištenih uložaka reagensa (RC) pogledajte „Pohrana i rukovanje reagensima”.

16. Bacite iskorištene epruvete za uzorke i otpad u skladu s lokalnim sigurnosnim propisima. Sigurnosne informacije potražite u „Upozorenja i mjere opreza”.
17. Očistite instrument QIASymphony SP.

Slijedite upute za održavanje iz priručnika za korisnika koji su priloženi uz instrument. Redovito čistite štitnike vršaka kako biste smanjili rizik od unakrsne kontaminacije.

18. Zatvorite ladice instrumenta i isključite napajanje instrumenta QIASymphony SP.

Kontrola kvalitete

U skladu sa sustavom za upravljanje kvalitetom društva QIAGEN certificiranim u skladu s normom ISO, svaka serija kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) ispituje se prema unaprijed određenim specifikacijama kako bi se osigurala dosljedna kvaliteta proizvoda.

Ograničenja

Radne značajke sustava utvrđene su ispitivanjima za procjenu radnih značajki u kojima se pročišćavala ccfDNA iz plazme dobivene iz ljudske venske pune krvi prikupljene u epruvetu PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD).

Radne značajke kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) utvrđene su za ribosomski fragment 18S i Y-kromosomski fragment DYS14 slobodne cirkulirajuće DNK (circulating cell-free DNA, ccfDNA) u plazmi.

Odgovornost je korisnika potvrditi radne značajke sustava za sve postupke koji se izvode u laboratoriju, a koje ne pokrivaju ispitivanja za procjenu radnih značajki koja su provela društva QIAGEN i PreAnalytiX.

Kako bi se rizik od negativnog utjecaja na dijagnostičke rezultate sveo na najmanju moguću mjeru, u postupcima daljnje obrade trebaju se upotrijebiti prikladne kontrole. Svi generirani dijagnostički rezultati moraju se tumačiti zajedno s drugim kliničkim ili laboratorijskim nalazima.

Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju problema koji mogu nastati. Za kontaktne podatke i popis često postavljenih pitanja posjetite odgovarajuću stranicu proizvođača na web-mjestu www.PreAnalytiX.com ili www.qiagen.com.

Komentari i prijedlozi

Općenito rukovanje

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Poruka pogreške prikazana na zaslonu osjetljivom na dodir | Ako se tijekom protokola prikazuje poruka pogreške, pogledajte korisničke priručnike isporučene s instrumentom. |
| b) | Različiti volumeni eluata nakon izvođenja postupka preko noći | Radi optimiziranja protoka, komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) omogućuje obradu uzoraka preko noći hlađenjem eluata na instrumentu QIASymphony SP. Tijekom dugih razdoblja hlađenja, volumeni eluata mogu se promijeniti ovisno o temperaturi i vlažnosti u laboratoriju. Na primjer, ako je odabrani volumen bio 60 µl na temperaturi od 15 – 25 °C i pri vlažnosti od 30 – 60 %, volumen bi mogao biti u rasponu od 50 – 85 µl nakon 12 sati pohrane na instrumentu. |

Krioprecipitati nakon odmrzavanja uzoraka plazme

- | | | |
|----|--|---|
| a) | U plazmi se stvaraju krioprecipitati | Kako bi se spriječilo stvaranje krioprecipitata, plazma se može odmrzavati na 30 °C u trajanju od 30 minuta umjesto na sobnoj temperaturi. Nemojte odmrzavati na nižim temperaturama (npr. 4 °C). Nakon odmrzavanja vrložno miješajte epruvetu 30 sekundi |
| b) | Nizak prinos ccfDNA iz plazme nakon uklanjanja krioprecipitata | Nemojte centrifugirati plazmu za uklanjanje krioprecipitata jer oni mogu sadržavati ccfDNA. |

Nedovoljan volumen plazme u epruvetama PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD)

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Manje od 10 ml krvi prikupljeno u epruveti PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) | Pobrinite se da je 10 ml krvi prikupljeno u epruveti PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD). Pogledajte upute za uporabu epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube. |
| b) | Visoka razina frakcije stanica | Visoka razina frakcije stanica (hematokrita) u ljudskoj punoj krvi (npr. više od 51 % kod muškaraca ili 47 % kod žena) može uzrokovati smanjene volumene plazme. |
| c) | Nizak prinos plazme nakon centrifugiranja | Na prinose plazme može utjecati dulje razdoblje pohrane krvi ili uvjeti centrifugiranja koji se razlikuju od navedenih. |

Komentari i prijedlozi

Precipitat u spremniku otvorenog uložka reagensa (reagent cartridge, RC) u sklopu kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD)

- a) Isparavanje pufera Prekomjerno isparavanje može uzrokovati povećanu koncentraciju soli u puferima. Bacite uložak reagensa (reagent cartridge, RC). Kada se ne upotrebljavaju za pročišćavanje, obavezno zatvorite spremnike pufera na djelomično iskorištenom ulošku reagensa (reagent cartridge, RC) stripovima za zatvaranje radi ponovne uporabe.
- b) Pohrana uložka reagensa (reagent cartridge, RC) Pohrana (reagent cartridge, RC) na temperaturi nižoj od 15 °C može uzrokovati stvaranje precipitata.

Nizak prinos ccfDNA

- a) Magnetske čestice nisu bile potpuno resuspendirane Prije početka postupka provjerite jesu li magnetske čestice potpuno resuspendirane. Prije uporabe vrtložno miješajte barem 3 minute. Nepotpuno resuspendiranje može dovesti do pogrešaka pri pipetiranju.
- b) Začepljenje vrška pipete zbog netopivog materijala Netopivi materijal nije uklonjen iz uzorka prije pokretanja postupka pročišćavanja na instrumentu QIASymphony SP.
- c) Materijal uzorka sadržava nisku koncentraciju ccfDNA Zbog vrlo male količine ccfDNA u uzorcima plazme, mjerenje koncentracije ccfDNA može biti izazovno ovisno o metodi kvantifikacije koja se primjenjuje.
Za provjeru koncentracije ccfDNA u eluatima preporučuje se primjena osjetljive metode qPCR.
- d) Neispravno zatvaranje uložka reagensa (RC) Izmjena s okolnim zrakom može dovesti do smanjene stabilnosti pufera što dovodi do smanjene učinkovitosti ekstrakcije ccfDNA s djelomično iskorištenim uloškom reagensa (reagent cartridge, RC). Kada se ne upotrebljavaju za pročišćavanje, obavezno pažljivo zatvorite spremnike pufera na djelomično iskorištenom ulošku reagensa (reagent cartridge, RC) stripovima za zatvaranje radi ponovne uporabe.

Slabe radne značajke ccfDNA u postupcima daljnje obrade

- a) Eluat koncentriran vakuumskim centrifugiranjem Nemojte koncentrirati eluat vakuumskim centrifugiranjem (npr. u instrumentu SpeedVac® ili sličnom). To može dovesti do razgradnje zbog visokih temperatura i koncentriranih soli u eluatu, što može ometati izvođenje postupaka daljnje obrade.
- b) Prijenos čestica Magnetske čestice se uglavnom ne prenose u eluate. U slučaju da dođe do prijenosa, magnetske čestice u eluatima neće utjecati na većinu postupaka daljnje obrade. U slučaju da su za određene daljnje postupke ispitivanja potrebne vrlo velike količine eluata, eluati se mogu centrifugirati i prenijeti u čistu epruvetu.

Nema prijenosa uzorka ili je nepotpun

- a) Postavljen je neispravan volumen uzorka za standardne protokole Ako je postavljen manji volumen uzorka od navedenog, postoji povećani rizik od toga da se uzorak označi kao nejasan ili od toga da se uzorak uopće ne prenese (označi kao nevažeci).
Postavite ispravan volumen uzorka naveden na listu protokola i popisu laboratorijskih proizvoda.
- b) Mjehurići i/ili pjena u epruveti za uzorke Mjehurići ili pjena u uzorku i/ili epruveti za unos uzorka mogu dovesti do neispravnog otkrivanja razine tekućine te time i do nepotpunog prijenosa uzorka. Uklonite mjehuriće iz epruvete za uzorke.

Simboli

U uputama za uporabu ili na ambalaži i naljepnicama mogu se pojaviti sljedeći simboli:



<N>

Sadržava dovoljno reagensa za <N> testova Označava ukupan broj IVD testova koji se mogu izvoditi s pomoću proizvoda za IVD.



Upotrijebiti do



In vitro dijagnostički medicinski proizvod



Oznaka CE. Ova proizvod ispunjava zahtjeve Uredbe Europske unije 2017/746 o in vitro dijagnostičkim medicinskim proizvodima.



Kataloški broj



Broj serije



Broj materijala (tj. oznaka komponente)



Komponente (tj. popis svega što je isporučeno)



Sadržava (sadržaj)

NUM

Broj (tj. bočice, boce)

GTIN

Globalni broj trgovačke jedinice

Rn

R se odnosi na reviziju uputa za uporabu (priručnika), a n je broj revizije



Ograničenje temperature



Proizvođač



Pročitajte upute za uporabu



Oprez

PROTK

Proteinase K

WELL

Broj jažice (npr. jažice u ulošku reagensa (reagent cartridge, RC))

REAG | **CART**

Uložak reagensa

Sodium azide

Natrijev azid

Dodatak: Kvantifikacija ccfDNA

Zbog vrlo niskih koncentracija ccfDNA u materijalima uzorka, ne preporučuje se mjerenje DNK spektrofotometrom. Za određivanje koncentracije ccfDNA treba se upotrebljavati osjetljivo ili točno ispitivanje za kvantifikaciju temeljeno na fluorescenciji ili ispitivanje real-time PCR.

Ako treba ukloniti magnetske čestice, stavite epruvetu koja sadržava DNK u prikladan magnetski separator (npr. QIAGEN 12-Tube Magnet, kat. br. 36912) sve dok se magnetske čestice ne odvoje.

Ako se DNK nalazi u mikropločicama, stavite mikropločicu u prikladan magnetski separator (npr. QIAGEN 96-Well Magnet Type A, kat. br. 36915) sve dok se magnetske čestice ne odvoje. Ako prikladan magnetski separator nije dostupan, centrifugirajte epruvetu koja sadržava DNK u mikrocentrifugi 1 minutu na punoj brzini radi stvaranja taloga svih preostalih magnetskih čestica.

Informacije za narudžbu

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
PreAnalytiX		
QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) (192)	Uključuje 2 uloška reagensa (reagent cartridge, RC), epruvete s Proteinase K i pribor	768566
PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) (100)	100 epruveta: 16 x 100 mm, 1,5 ml aditiva, količina izvađene krvi 10 ml	768165
QIAGEN		
QIASymphony SP instrument	Modul za pripremu uzoraka QIASymphony, 1-godišnje jamstvo na dijelove i rad	9001297
Povezani proizvodi društva QIAGEN		
Proteinase K (10 ml)	Bočica 1 x 10 ml	19133
Reagent Cartridge Holder (2)	Držać uloška reagensa (reagent cartridge, RC) za uporabu na instrumentu QIASymphony SP	997008
Cooling Adapter, 2 ml, v2, Qsym	Adapter za hlađenje za epruvete s navojnim čepom od 2 ml. Za uporabu u ladici „Eluate” (Eluat) na instrumentu QIASymphony SP	9020674
Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym	Adapter za hlađenje za EMT stalke. Za uporabu u ladici „Eluate” (Eluat) na instrumentu QIASymphony SP	9020730
Cooling Adapter, Snap-Cap Microtube QIASymphony, Qsym	Adapter za hlađenje za epruvete Eppendorf® LoBind Snap Cap Safe-Lock od 1,5 ml. Za uporabu u ladici „Eluate” (Eluat) na instrumentu QIASymphony SP	9020731

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Ulošci za pripremu uzoraka s 8 jažica za uporabu na instrumentu QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Pokrovi za 8 štapića za uporabu na instrumentu QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl (1024)	Jednokratni vršci s filtrom, na stalku; (8 x 128). Za uporabu s instrumentima QIAcube® i QIASymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Jednokratni vršci s filtrom, na stalku; (8 x 128). Za uporabu na instrumentu QIASymphony SP/AS	997024
Tip Disposal Bags (15)	Vrećice za odlaganja vršaka za uporabu na instrumentu QIASymphony SP	9013395
12-Tube Magnet	Magnet za odvajanje magnetskih čestica u epruветama 12 x 1,5 ml ili 2 ml	36912
96-Well Magnet Type A	Magnet za odvajanje magnetskih čestica u jažicama na pločicama s 96 jažica, 2 x 96-Well Microplates FB	36915
Reuse Seal Set (20)	Kompleti Reuse Seal Set za zatvaranje djelomično iskorištenih uložaka reagensa (RC) QIASymphony	997006
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Nesterilne polipropilenske epruветe (maksimalnog kapaciteta 0,85 ml, kapaciteta pohrane manjeg od 0,7 ml, kapaciteta elucije od 0,4 ml); 2304 u stalcima s 96 jažica; uključuje stripove čepova	19588

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
Caps for Elution Microtubes (50 x 8)	Čepovi za mikroeprovete za eluciju (50 x 8)	19591
14 ml Falcon Tube	Polistirenska epruveta sa zaobljenim dnom veličine 17 x 100 mm koja se koristi kao nosač uzorka na instrumentu QIASymphony SP	Corning, 352051

Ažurirane informacije o licenciranju i izjave specifične za proizvod pogledajte u odgovarajućem priručniku za QIAGEN komplet ili priručniku za korisnika. Priručnici za QIAGEN komplete i korisnički priručnici dostupni su na web-mjestima **www.PreAnalytiX.com** i **www.qiagen.com** ili ih možete zatražiti od tehničke službe tvrtke QIAGEN ili svojeg lokalnog distributera.

Povijest revizija dokumenta

Revizija	Opis
R1, svibanj 2021.	Prvo izdanje

Narudžbe www.qiagen.com/shop | Tehnička podrška support.qiagen.com | Web-mjesto www.qiagen.com ili PreAnalytiX.com