

Únor 2023

Sada QIASymphony® PAXgene® Blood ccfDNA Kit – návod k použití (příručka)



192

Verze 1



Pro diagnostické použití in vitro



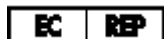
768566



PreAnalytiX GmbH

Garstligweg 8, 8634 Hombrechtikon, Švýcarsko

1130770CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

8634 Hombrechtikon

Švýcarsko

www.PreAnalytiX.com

Ochranné známky: PAXgene®, PreAnalytiX® (PreAnalytiX GmbH)
QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, QIASymphony® (skupina QIAGEN)
BD™ (Becton Dickinson and Company)
Corning®, Falcon® (Corning, Inc.)
Eppendorf® (Eppendorf AG)
SpeedVac® (Thermo Fisher Scientific nebo její přidružené společnosti).

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

1130770CS HB-2866-003

© 2023 PreAnalytiX GmbH. Pokud není uvedeno jinak, PreAnalytiX, logo PreAnalytiX a ostatní ochranné známky jsou majetkem společnosti PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

Omezená licenční smlouva pro sadu QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit

Použitím produktu vyjadřuje kupující nebo uživatel sady QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponentami dodanými v sadě. Společnost PreAnalytiX® neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v této sadě, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v této sadě obsaženy, s výjimkou případů popsaných v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com a www.PreAnalytiX.com.
2. Mimo výslovně uvedenou licenci společnost PreAnalytiX neposkytuje žádnou záruku, že tato sada a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tento spotřební materiál a jeho součásti jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmějí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost PreAnalytiX zvláště vylučuje odpovědnost za jakékoliv jiné licence, vyjádřené či implikované, než výslovně uvedené.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakékoliv shora zakázané činnosti anebo ji usnadnit. Společnost PreAnalytiX může prosazovat zákazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy, včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se sadou a/nebo jejími komponentami.

Aktualizované licenční podmínky jsou uvedeny na stránkách www.qiagen.com a www.PreAnalytiX.com.

Distributoři společnosti PreAnalytiX

Produkty PreAnalytiX vyrábějí nebo distribuují společnosti QIAGEN a BD pro společnost PreAnalytiX.

Obsah

Obsah	3
Účel použití	5
Určený uživatel.....	5
Popis a principy	6
Shrnutí a vysvětlení	6
Principy postupu	7
Dodávané materiály.....	9
Obsah sady	9
Potřebný materiál, který není součástí dodávky.....	10
Vybavení	10
Varování a bezpečnostní opatření	11
Informace o bezpečnosti.....	11
Bezpečnostní opatření	12
Skladování reagensů a manipulace s nimi.....	14
Součásti sady.....	14
Odběr a příprava vzorků	16
Postup	20
Přehled: Automatická purifikace ccfDNA na přístroji QIASymphony SP.....	20
Přehled protokolu	25
Protokol: Automatická purifikace ccfDNA na přístroji QIASymphony SP	28
Kontrola kvality	32
Omezení	32

Návod na řešení potíží.....	33
Symboly	36
Příloha: Kvantifikace ccfDNA.....	38
Informace pro objednání.....	39
Historie revizí dokumentu.....	41

Účel použití

Sada QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit, na použití s přístrojem QIASymphony SP, je určena na automatickou izolaci a purifikaci cirkulující bezbuněčné DNA (ccfDNA) z plazmy generované z plné lidské venózní krve odebrané ve zkumavce PAXgene Blood ccfDNA Tube.

Sada QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit využívá technologii magnetických částic pro automatickou izolaci a purifikaci ccfDNA z lidské plazmy.

Sada QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit je určena pro diagnostické použití *in vitro* a k použití profesionálními uživateli, například techniky a lékaři, kteří jsou vyškoleni v technikách molekulární biologie.

Určený uživatel

Tato sada je určena pro profesionální použití.

Tento výrobek je určen k použití personálem speciálně instruovaným a vyškoleným v technikách molekulární biologie, který je důkladně obeznámen s touto technologií.

Popis a principy

Shrnutí a vysvětlení

Cirkulující bezbuněčná DNA (ccfDNA) je v plazmě přítomna obvykle jako krátké fragmenty (< 1000 bp). Koncentrace ccfDNA v plazmě je obvykle nízká (může se pohybovat v rozmezí 1 až 100 ng/ml) a mezi jednotlivými osobami se značně liší. Zkumavka PreAnalytiX PAXgene Blood ccfDNA Tube s označením CE v kombinaci se sadou QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit představuje standardizovaný pracovní postup pro odběr, skladování a transport krve, stabilizaci DNA v uzavřené zkumavce a následnou izolaci a purifikaci ccfDNA z lidské plazmy pomocí přístroje QIAGEN® QIASymphony SP.

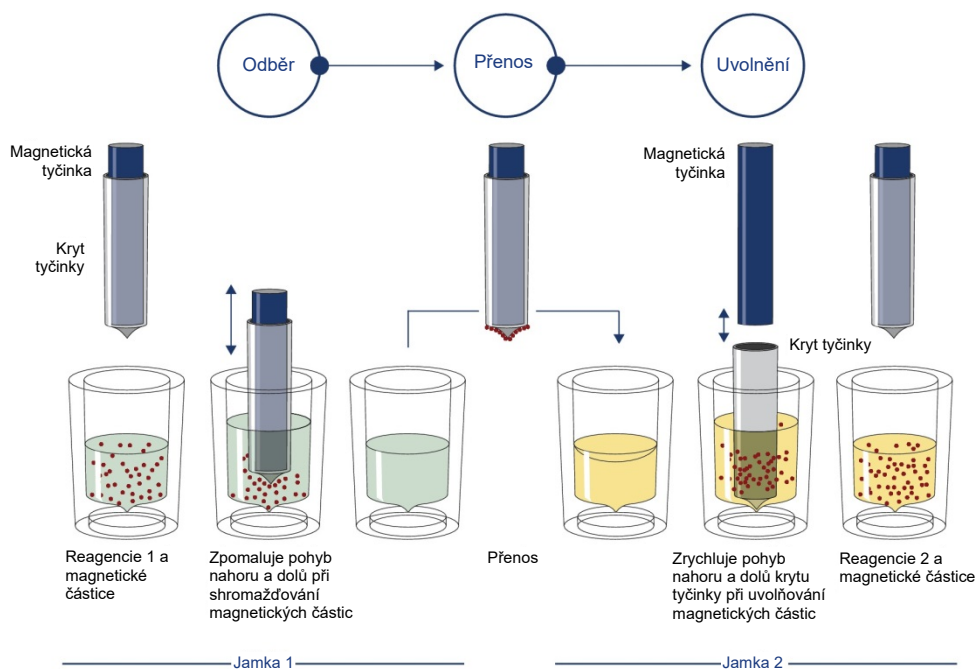
Na přístroji QIASymphony SP jsou k dispozici protokoly pro extrakci ccfDNA z 2,4 a 4,8 ml plazmy získané ze zkumavek PAXgene Blood ccfDNA Tube dvojitou centrifugací. Plazma se přenesení a zpracuje v sekundární zkumavce v přístroji QIASymphony SP.

Alternativně jsou v přístroji QIASymphony SP k dispozici protokoly pro zpracování odběrové zkumavky pro vstupní objem plazmy 2,4 a 4 ml. V tomto případě není třeba provádět druhý krok centrifugace ani přenášet plazmu do sekundární zkumavky.

Sada QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit s technologií magnetických částic umožňuje purifikaci vysoce kvalitní ccfDNA, která neobsahuje proteiny, nukleázy a další nečistoty. Přístroj QIASymphony SP provádí všechny kroky postupu purifikace. V jednom cyklu se zpracovává až 96 vzorků v šaržích po 24. Při izolování genomové DNA (gDNA) z nukleované buněčné frakce krve odebrané do zkumavek PAXgene Blood ccfDNA Tube na přístroji QIASymphony SP se řiďte pokyny uvedenými v návodu k použití zkumavky PAXgene Blood ccfDNA Tube (www.PreAnalytiX.com).

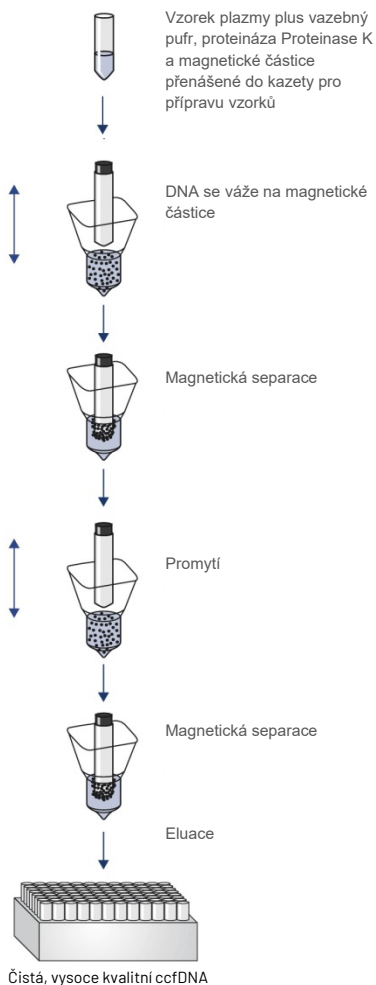
Principy postupu

Technologie přístroje QIASymphony SP kombinuje rychlost a účinnost purifikace nukleových kyselin na bázi aniontové výměny a pohodlnou manipulaci s magnetickými částicemi (obrázek 1). Postup purifikace je určen k zajištění bezpečné a reprodukovatelné manipulace s potenciálně infekčními vzorky a zahrnuje 3 kroky: vázání, promývání a eluci (obrázek 2). Uživatelé si mohou zvolit různé vstupní objemy vzorků.



Obrázek 1. Schématické znázornění principu činnosti přístroje QIASymphony SP. Přístroj QIASymphony SP zpracovává vzorek obsahující magnetické částice následujícím způsobem: magnetická tyčinka, chráněná krytem tyčinky, vstupuje do jamky obsahující vzorek a přitahuje magnetické částice. Kryt magnetické tyčinky se umístí nad jinou jamku a magnetické částice se uvolní. Tyto kroky se během zpracování vzorku několikrát opakují. Přístroj QIASymphony SP používá magnetickou hlavu obsahující soupravu 24 magnetických tyčinek, a může proto současně zpracovávat až 24 vzorků.

Sada QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit



Obrázek 2. Kroky pro extrakci ccfDNA pomocí sady QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit. Fragments ccfDNA jsou izolovány z plazmy získané z lidské plně venózní krve odebrané do zkumavky PAXgene Blood ccfDNA Tube. Během prvního kroku zpracování jsou plazmatické proteiny štěpeny proteinázou Proteinase K, zatímco ccfDNA se váže na povrch magnetických částic. Tři promývací kroky zaručují odstranění nečistot. Nakonec je ccfDNA eluována z magnetických částic a je připravena k použití v následných aplikacích.

Dodávané materiály

Obsah sady

Sada OIA Symphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) Katalogové č. Počet reakcí		(192) 768566 192		
Zkratka	Identita	Množství	Účinné přísady	Koncentrace [%]**
RC	Reagent cartridge (Kazeta s reagensiemi)*†	2	Neiontový detergent Magnetická částice pro výměnu aniontů NaOH Ethanol	≥ 0,5 – <10 [hm./hm.] – ≥ 0,05 – < 0,1 [hm./hm.] ≥ 70 – < 90 [obj./obj.]
PROTK	Proteinase K (Proteináza K)†	5 × 10 ml	Proteinase K	≥ 1 – < 3 [hm/hm]
PL	Piercing lid (Děrovací víčko)	2	–	–
RSS	Reuse Seal Set (Opětovně použitelná uzavírací sada)‡	2	–	–
	Elution Microtubes CL (Eluční mikrozukmavky CL), ve stojanech#	2	–	–
	Caps for Elution Microtubes (Víčka pro eluční mikrozukmavky)#	1 × (55 × 8)	–	–
	Návod k použití (příručka)	1	–	–
	PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool	1	–	–

* Obsahuje azid sodný jako konzervační látku.

† Seznam symbolů a jejich definice jsou uvedeny na straně 36.

‡ Opakovaně použitelná uzavírací sada Reuse Seal Set obsahuje 8 uzavíracích proužků pro opakované použití.

K dispozici také samostatně, viz Informace pro objednání.

** Maximální koncentrace v jedné jamce.

Potřebný materiál, který není součástí dodávky

Při práci s chemickými látkami a biologickými vzorky vždy dodržujte obecně platná bezpečnostní opatření a v souladu se zásadami a postupy vašeho pracoviště noste vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele daného výrobku.

Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a nakalibrovány podle doporučení výrobce.

- Sample Prep Cartridges, 8-well (QIAGEN, kat. č. 997002)
- 8-Rod Covers (QIAGEN, kat. č. 997004)
- Filter-Tips, 200 µl a 1 500 µl (QIAGEN, kat. čísla 990332 a 997024 v daném pořadí)
- Tip Disposal Bags (QIAGEN, kat. č. 9013395)
- PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) (PreAnalytiX, kat. č. 768165)
- Zkumavky na vzorky. Kompatibilní formáty odběrových a sekundárních zkumavek naleznete v seznamu laboratorního vybavení, který je k dispozici v záložkách Product Resources (Produktové zdroje) a Resources (Zdroje) na stránkách produktu na adrese www.qiagen.com a www.PreAnalytiX.com, v daném pořadí.
- Kompatibilní formát eluční zkumavky je uveden v seznamu laboratorního vybavení, který lze nalézt v záložkách Product Resources (Produktové zdroje) a Resources (Zdroje) na stránkách produktu na adrese www.qiagen.com a www.PreAnalytiX.com, v daném pořadí.

Vybavení*

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

* Před použitím zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a nakalibrovány podle doporučení výrobce.

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostické použití in vitro.

Před použitím sady si pečlivě přečtěte všechny pokyny.

Zákazníci v Evropské unii by měli vzít na vědomí, že od nich může být vyžadováno nahlášení závažných událostí, ke kterým došlo v souvislosti se zařízením, a to výrobci a kompetentnímu orgánu členského státu, pod nějž uživatel a/nebo pacient spadá.

Informace o bezpečnosti

Při práci s chemickými látkami a biologickými vzorky vždy dodržujte obecně platná bezpečnostní opatření a v souladu se zásadami a postupy vašeho pracoviště noste vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online ve formátu PDF na stránkách www.qiagen.com/safety, kde si uživatelé mohou vyhledat, zobrazit a vytisknout BL pro každou sadu PreAnalytiX a pro každou komponentu příslušné sady.

- Veškeré chemikálie a biologické materiály jsou potenciálně nebezpečné. Vzorky krve a alikvoty jsou potenciálně infekční, a musí se s nimi proto zacházet jako s biologicky nebezpečnými materiály.
- Biologicky nebezpečné materiály a odpad ze sad zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

Nouzová linka

CHEMTREC

USA a Kanada 1-800-424-9300

Mimo USA a Kanadu +1 703-527-3887

Bezpečnostní opatření

Pufry v kazetě s reagensiemi (Reagent Cartridge, RC) obsahují azid sodný. Pokud dojde k rozlití pufrů z této sady, vyčistěte místo vhodným laboratorním detergentem a vodou. Pokud rozlitá kapalina obsahuje případná infekční agens, vyčistěte zasažené místo nejdříve laboratorním detergentem a vodou, a potom 1 % (obj.) roztokem chlornanu sodného (dezinfekčního prostředku).

Pro jednotlivé komponenty sady QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit platí následující pokyny týkající se rizika a bezpečnostních opatření.

MBS3

Obsahuje: azid sodný. Varování! Může být škodlivý při požití. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

Proteinase K



Obsahuje: proteinázu Proteinase K. Nebezpečí! Způsobuje mírné podráždění kůže. Při vdechnutí může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu, případně dechové obtíže. Vyvarujte se vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/výparů/aerosolů. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. Používejte ochranný respirátor. Pokud dojde k zasažení nebo důvodné obavě, že došlo k zasažení: Kontaktujte toxikologické informační středisko nebo lékaře. Přeneste postiženého na čerstvý vzduch a ponechte ho v klidu v poloze usnadňující dýchání.

QSE2



Obsahuje: hydroxid sodný. Nebezpečí! Způsobuje závažné popáleniny pokožky a poškození očí. Obsah/nádobu likvidujte ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu. **Při zasažení očí:** Opatrně oplachujte vodou po dobu několika minut. Pokud zasažená osoba používá kontaktní čočky, vyjměte je (pokud je to možné). Pokračujte v oplachování. **Při styku s kůží (nebo s vlasy):** Okamžitě odstraňte nebo svlékněte veškeré kontaminované oblečení. Opláchněte pokožku vodou/sprchou. Ihned kontaktujte toxikologické informační středisko nebo lékaře. Skladujte uzamčené. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

QSW9



Obsahuje: etanol. Nebezpečí! Vyroce hořlavá kapalina a páry. Způsobuje vážné podráždění očí. Chraňte před teplem/jiskrami / otevřeným plamenem / horkými povrchy. Zákaz kouření. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

Skladování reagensií a manipulace s nimi

Sada QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit se musí uchovávat ve svislé poloze při pokojové teplotě (15–25 °C). Magnetické částice v kazetách s reagensiemi (Reagent Cartridge, RC) zůstávají při uchovávání v tomto teplotním rozmezí aktivní.

Poznámka: Štítek na krabici se sadou QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit udává dobu použitelnosti sady. Datum použitelnosti se týká kazety s reagensiemi.

Po uplynutí doby použitelnosti sadu QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit nepoužívejte.

Součásti sady

Sada QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit obsahuje roztok proteinázy Proteinase K připravený k okamžitému použití, který lze uchovávat při pokojové teplotě (15–25 °C).

Kazety RC neuchovávejte při teplotách pod 15 °C.

Otevřené kazety RC ze sady QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit lze skladovat při pokojové teplotě (15–25 °C) po dobu až 4 týdnů, což umožňuje nákladově efektivní opakované použití reagensií a flexibilnější zpracování vzorků, pokud jsou po použití řádně uzavřeny. Pokud se kazeta RC použije částečně, vyměňte kryt vaničky obsahující magnetické částice a bezprostředně po skončení cyklu protokolu uzavřete kazetu RC dodávanými, opětovně použitelnými uzavíracími proužky, aby nedošlo k odpařování.

Aby se zabránilo odpařování reagensií, měla by být kazeta RC otevřena maximálně 15 hodin (včetně doby provozu) při maximální teplotě prostředí 32 °C. Nesprávné skladování komponent sady může vést ke zrychlenému stárnutí pufrů.

Zpracování šarží s nízkým počtem vzorků (< 24) zvyšuje jak dobu, po kterou je kazeta RC otevřená, tak požadované objemy pufru, což potenciálně snižuje celkový počet možných stanovení vzorků na jednu kazetu.

Chraňte kazety RC před působením UV záření (např. používaného pro dekontaminaci), protože expozice může způsobit zrychlené stárnutí kazet RC a pufrů.

Je třeba věnovat odpovídající pozornost datům použitelnosti a podmínkám skladování vytištěným na obalu a štítcích všech komponent. Nepoužívejte součásti s prošlým datem expirace ani nesprávně skladované součásti.

Odběr a příprava vzorků

Postup purifikace je optimalizován pro použití s plazmou získanou z krve odebrané ve zkumavkách PAXgene Blood ccfDNA Tube. Informace o odběru krve, manipulaci s těmito zkumavkami a přípravě plazmy naleznete v návodu k použití zkumavek PAXgene Blood ccfDNA Tube, který naleznete v záložkách Product Resources (Produktové zdroje) a Resources (Zdroje) na stránkách produktu na internetové adrese www.qiagen.com, respektive www.PreAnalytiX.com.

Přípravu plazmy lze provádět (A) pomocí standardního protokolu dvojité centrifugace nebo (B) prostřednictvím manipulace s odběrovou zkumavkou: přímého zpracování jednotlivých odstředěných zkumavek PAXgene Blood ccfDNA Tube na přístroji QIASymphony SP.

A) Příprava plazmy z krve pro standardní protokoly

1. Odstředíte zkumavku PAXgene Blood ccfDNA Tube při pokojové teplotě (15–25 °C) po dobu 15 minut při 1600–3000 × g (první centrifugace) pomocí vyvážené vytahovací lopatkové odstředivky. Pokud se upřednostňuje brzdění, doporučujeme použít střední úroveň brzdění, kterou je potřeba validovat pro váš konkrétní pracovní postup.

Poznámka: Aby vzorky uchovávané před centrifugací v chladu fungovaly co nejlépe, promíchejte znovu vzorek tak, že jej třikrát převrátíte, a nechte zkumavku před zpracováním ohřát na pokojovou teplotu.

2. Napipetujte plazmu do 15 ml odstředivkové zkumavky s kónickým dnem (není součástí dodávky), přičemž dbejte na to, abyste neporušili jadernou buněčnou frakci.

3. Odstřeďte 15 ml odstředivkovou zkumavku s kónickým dnem při pokojové teplotě (15–25 °C) po dobu 10 minut při 1600–3000 × g (druhá centrifugace) pomocí vyvážené odstředivky.

Poznámka: Nepřekračujte maximální rychlost odstřeďování doporučenou výrobcem sekundární zkumavky.

4. Napipetujte požadovaný objem plazmy (viz část „Objem vzorku“, strana 20) do 14 ml polystyrenové zkumavky s kulatým dnem o rozměrech 17 × 100 mm, přičemž dbejte na to, aby nedošlo k narušení pelet zbytkových krevních buněk, pokud jsou přítomny.

5. Přeneste zkumavku s kulatým dnem se vzorkem plazmy do nosiče zkumavek a vložte nosič zkumavek do zásuvky pro vložení vzorku přístroje QIASymphony SP.

Poznámka: Pro maximální výtěžek ccfDNA zpracujte maximální dostupný objem plazmy.

Poznámka: Zamezte vytvoření pěny na povrchu nebo uvnitř vzorků plazmy během pipetování. Pěna nebo vzduchové bubliny na vzorcích mohou vést k pipetování nesprávného objemu vzorku.

Poznámka: Po přenosu plazmy do sekundární zkumavky je ccfDNA stabilní v plazmě při teplotě 15–25 °C po dobu až 3 dnů nebo při teplotě 2–8 °C po dobu až 7 dnů. Při delším skladování doporučujeme zmrazení alikvotních podílů na teplotu -20 °C nebo -80 °C.

Poznámka: Při použití dříve uložených vzorků plazmy (např. skladovaných při teplotě 2–8 °C nebo zmrazených na -20 nebo -80 °C) je třeba je před zahájením zpracování nechat vytemperovat na pokojovou teplotu (15–25 °C), v případě zmrazených vzorků viz část „C) Zmrazování a rozmrazování vzorků plazmy zpracovaných ze zkumavky PAXgene Blood ccfDNA Tube“.

B) Výroba plazmy z krve pro manipulaci s odběrovou zkumavkou na přístroji QIASymphony SP

1. Odstřeďte zkumavku PAXgene Blood ccfDNA Tube při pokojové teplotě (15–25 °C) po dobu 15 minut při 3000 × g pomocí vyvážené vytahovací lopatkové odstředivky. Pokud se upřednostňuje brzdění, doporučujeme použít střední úroveň brzdění, kterou je potřeba validovat pro váš konkrétní pracovní postup.

Poznámka: Aby vzorky uchovávané před centrifugací v chladu fungovaly co nejlépe, promíchejte znovu vzorek tak, že jej třikrát převrátíte, a nechte zkumavky před zpracováním ohřát na pokojovou teplotu.

2. Po vyjmutí z kádinky odstředivky kvantifikujte objem plazmy v každé zkumavce pomocí nástroje PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool, který se dodává jako obsah sady (obrázek 3). Po vyjmutí zkumavky z odstředivky se modrozelená šipka na nástroji zarovná s rozhraním plazma/buňka. Modré čáry označují, zda je plazmatická hladina dostatečná pro protokol manipulace s odběrovou zkumavkou o objemu 2,4 nebo 4,0 ml. Pro protokol 2,4 ml je zapotřebí minimální výška sloupce plazmy 2,3 cm a pro protokol 4,0 ml je zapotřebí minimálně 3,4 cm.

Poznámka: V případě, že nedojde k jasnému oddělení plazmatické a buněčné frakce nebo dojde k náhodnému smíchání fází po vyjmutí z odstředivky, odstřeďování je potřeba zopakovat.

Poznámka: Před umístěním zkumavky na přístroj zkontrolujte, jestli došlo k jasnému oddělení.

3. Před umístěním na přístroj QIASymphony SP pro přímou extrakci ccfDNA sejměte ze zkumavek PAXgene Blood ccfDNA Tube uzávěr Hemogard Closure Cap.

Poznámka: Odstranění uzávěru zkumavky a manipulace s otevřenými zkumavkami by měly být prováděny opatrně, aby se snížilo potenciální riziko rozlití vzorku, křížové kontaminace mezi zkumavkami a vystavení krvi.

4. Do nosiče zkumavek vložte otevřené zkumavky PAXgene Blood ccfDNA Tube, které obsahují dostatečné množství plazmy, a nosič zkumavek vložte do vstupní zásuvky pro vzorky přístroje QIASymphony SP.

C) Zmrazování a rozmrazování vzorků plazmy zpracovaných ze zkumavky PAXgene Blood ccfDNA Tube

1. Pro zmrazení přeneste plazmu do vhodných zkumavek (např. kryolahviček) umístěných ve vhodném stojanu.
2. Plazmu zmrazte a uchovávejte při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro skladování při teplotě nižší než $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zmrazte vzorky plazmy nejprve při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu nejméně 24 hodin a poté je přeneste do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Plazmu rozmrazujte při pokojové teplotě ($15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Poznámka: Nerozmrazujte při nízkých teplotách (např. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4. Pokud se v plazmě vytvoří kryoprecipitáty, po rozmrazení zkumavku 30 s vortexujte a vzorek použijte pro postup izolace ccfDNA přístrojem QIASymphony SP bez další úpravy.

Poznámka: Nedoporučuje se kvůli odstranění kryoprecipitátů plazmu odstřeďovat, protože tyto kryoprecipitáty mohou obsahovat ccfDNA.

Poznámka: Aby se zabránilo tvorbě kryoprecipitátů, lze plazmu rozmrazovat při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut namísto při pokojové teplotě.

Postup

Přehled: Automatická purifikace ccfDNA na přístroji QIASymphony SP

Přístroj QIASymphony SP usnadňuje automatickou přípravu vzorků a zvyšuje pohodlí přípravy. Vzorky, reagentie, spotřební materiál a eluáty jsou odděleně uchovávány v různých zásuvkách. Před vlastním zpracováním jednoduše založte vzorky, kazety s reagentiemi a spotřební materiál předem umístěný ve stojánek do příslušné zásuvky. Spusťte protokol a po zpracování vyjměte purifikovanou ccfDNA ze zásuvky „Eluate“ (Eluát). Instrukce naleznete v uživatelských příručkách dodávaných s vaším přístrojem.

Poznámka: Volitelná údržba není pro funkci přístroje povinná, ale velmi ji doporučujeme pro snížení rizika kontaminace.

Objem vzorku

Aby se při běžném pracovním postupu přístrojem přeneslo 2,4 ml (protokol PAXcircDNA_2400) a 4,8 ml (protokol PAXcircDNA_4800), vyžaduje se prázdný objem 0,4, respektive 0,5 ml, což znamená, že je nutno poskytnout vstup vzorku minimálně 2,8, respektive 5,3 ml. V případě, že jsou k dispozici nižší objemy plazmy než 2,8 či 5,3 ml, **režim Less Sample** (Méně vzorků), coby integrovaná součást funkce protokolu, automaticky umožňuje přenos nižších objemů plazmy, než je uvedeno. V tomto případě se nástrojem přenesou méně vzorků. Rozdíl v pipetovaném objemu plazmy se zaznamená do souboru s výsledky. Kromě toho se příslušné vzorky označí jako **nejasné** (chybový kód 140043, **režim Enable Less Sample** (Povolit méně vzorků)). Minimální vstupní objemy plazmy pro aktivaci **režimu Less Sample** (Méně vzorků) jsou 1,6 ml a 4,1 ml. Pokud bude k dispozici menší objem vzorků, vzorky nebudou zpracovány a budou označeny jako **neplatné**. Pro postup manipulace s odběrovou zkumavkou se vhodný objem vzorku zajišťuje pomocí nástroje PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool, který se dodává jako obsah sady (je popsán v části „Příprava materiálu vzorků“ na straně 24).

Vkládání kazet RC do zásuvky „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotřební materiál)

Reagencie pro purifikaci ccfDNA jsou obsaženy v inovativní kazetě s reagensii (Reagent Cartridge, RC) (obrázek 3). Každá vanička kazety RC obsahuje speciální reagencie, jako např. magnetické částice, vazebný pufr, promývací pufr nebo eluční pufr. Jen částečně použité kazety RC lze znovu uzavřít pomocí opětovně použitelných uzavíracích proužků, čímž se předchází vytváření odpadu v důsledku zbylých reagensii na konci postupu purifikace.



Obrázek 3. Kazeta s reagensii (Reagent Cartridge, RC) QIASymphony. Kazeta RC obsahuje všechny reagencie potřebné pro zpracování protokolu.

Před zahájením postupu ověřte, že jsou magnetické částice plně resuspendované. Před prvním použitím vyjměte vaničku s magnetickými částicemi z podstavce kazety RC, rázně ji minimálně 3 minuty vortexujte a vložte zpátky do podstavce kazety RC.

Poznámka: Magnetické částice mohou změnit barvu. To nemá žádný vliv na výkon.

Kazetu RC vložte do držáku RC. Před prvním použitím kazety RC umístěte děrovací víčko na horní část kazety RC (obrázek 3).

Poznámka: Děrovací víčko je ostré. Při jeho pokládání na kazetu RC buďte opatrní. Ujistěte se, že jste umístili děrovací víčko na kazetu RC ve správném směru.

Po odstranění krytu vaničky s magnetickými částicemi se následně do zásuvky „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotřební materiál) vloží kazeta RC.

Částečně použité kazety RC lze uložit, dokud nebudou znovu potřeba (viz část „Skladování reagentů a manipulace s nimi“ na straně 14).

Poznámka: Je třeba přidat proteinázu Proteinase K (viz část „Co je třeba udělat, než začnete“ na straně 26).

Poznámka: Ujistěte se, že nejsou smíchány kazety RC, vaničky s magnetickými částicemi a lahvičky s proteinázou Proteinase K z různých šarží sad.

Vkládání umělohmotného vybavení do zásuvky „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotřební materiál)

Kazety pro přípravu vzorků, kryty 8-Rod Covers (oboje je seskládáno do jednotkových boxů) a jednorázové špičky-s filtrem (200 µl špičky se dodávají v modrých stojáncích, 1500 µl špičky se dodávají v černých stojáncích) se vkládají do zásuvky „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotřební materiál).

Poznámka: Ujistěte se, že jsou víka jednotkových boxů před vložením boxů do zásuvky „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotřební materiál) odstraněna.

Poznámka: Špičky mají filtry jako prevenci křížových kontaminací.

Do drážek pro stojánky na špičky na pracovní ploše přístroje QIASymphony SP lze vložit kterýkoliv typ stojánku na špičky. Přístroj QIASymphony SP identifikuje typ vložených špiček během kontroly vloženého obsahu („inventory scan“).

Poznámka: Nedoplňujte stojánky na špičky ani jednotkové boxy pro kazety pro přípravu vzorků nebo kryty 8-Rod Covers před spuštěním dalšího cyklu. Přístroj QIASymphony SP umí použít částečně použité stojánky na špičky a jednotkové boxy.

Informace o způsobu objednávání plastových předmětů najdete na straně 39.

Plnění zásuvky „Waste“ (Odpad)

Kazety pro přípravu vzorků a kryty 8-Rod Covers použité během cyklu se seskládají zpět do prázdných jednotkových boxů v zásuvce „Waste“ (Odpad). Ujistěte se, že zásuvka „Waste“ (Odpad) obsahuje dostatečné množství prázdných boxů pro plastový odpad generovaný při zpracování.

Poznámka: Ujistěte se, že jsou víka jednotkových boxů před vložením boxů do zásuvky „Waste“ (Odpad) odstraněna. Používáte-li boxy pro kryty 8-Rod Covers pro sběr použitých kazet pro přípravu vzorků a krytů 8-Rod Covers, ujistěte se, že z nich byla odstraněna distanční vložka.

Sáček pro použité špičky s filtrem musí být připevněn k přední straně zásuvky „Waste“ (Odpad).

Poznámka: Přítomnost odpadního sáčku na špičky není systémem kontrolována. Před začátkem zpracování se ujistěte, že je odpadní sáček správně připevněn. Další informace naleznete v uživatelských příručkách dodávaných s vaším přístrojem. Vyprázdněte odpadní sáček po zpracování maximálně 96 vzorků, aby se zamezilo nakupení špiček.

Odpadní kontejner sbírá tekutý odpad generovaný během postupu purifikace. Zásuvku „Waste“ (Odpad) lze zavřít jen tehdy, pokud je odpadní kontejner na místě. Tekutý odpad likvidujte podle místních bezpečnostních a ekologických předpisů.

Naplněné odpadní nádoby neautoklávejte. Vyprázdněte odpadní nádoby po zpracování maximálně 96 vzorků.

Plnění zásuvky „Eluate“ (Eluát)

Vložte požadovaný eluční stojánek do zásuvky „Eluate“ (Eluát). Dlouhodobé skladování eluátů v zásuvce „Eluate“ (Eluát) může způsobit odpařování nebo kondenzaci eluátů, proto se musí používat chladicí pozice. Používejte „Elution slot 1“ (Eluční drážka 1) pouze s odpovídajícím chladicím adaptérem.

Zvolený eluční objem (μl)*	Počáteční eluční objem (μl)†
60	75

* Toto je minimální dosažitelné množství eluátu ve výsledné eluční zkumavce u stojanu QIAGEN EMT (kat. č. 19588) a zkumavky Sarstedt screw cap tube o objemu 1,5 ml (kat. č. 72.607). V jednotlivých případech může být konečný eluční objem pro jednotlivé vzorky nižší až o 5 μl.

† Původní objem elučního pufry je vyžadován, aby bylo zajištěno, že skutečný objem eluátu odpovídá zvolenému objemu.

Kontrola vloženého obsahu

Před spuštěním cyklu přístroj zkontroluje, zda bylo do příslušných zásuvek vloženo pro testované sady dostatečné množství spotřebního materiálu.

Příprava materiálu vzorků

Viz „Odběr a příprava vzorků“, strana 16.

Skladování ccfDNA

Po přípravě vzorků lze eluáty ccfDNA skladovat při teplotě -20 nebo -80 °C. Zmrazené eluáty by se neměly rozmrazovat více než třikrát. Nejnovější informace o stabilitě ccfDNA v eluátech naleznete na stránce produktu na www.qiagen.com nebo www.PreAnalytiX.com.

Přehled protokolu

Tabulka 1. Přehled protokolu

Vzorek	Zpracování zkumavky PAXgene Blood ccfDNA Tube	Vstupní objem vzorku (vč. prázdného objemu) (ml)	Objem vzorku použitý pro odběr ccfDNA (ml)	Eluční objem (µl)	Protokol pro přístroj QIASymphony SP
Plazma získaná z lidské plně venózní krve, odebraná do zkumavek PAXgene Blood ccfDNA Tube	2× centrifugace, přenos plazmy do sekundární zkumavky	2,8	2,4	60	PAXcircDNA_2400
		5,3	4,8	60	PAXcircDNA_4800
	1× centrifugace, přímé zpracování na přístroji QIASymphony SP	Podle nástroje pro výběr	2,4	60	PAXcircDNA PrimaryTube_2400
			4,0	60	PAXcircDNA PrimaryTube_4000

Důležité body před zahájením používání

- Při práci s chemikáliemi a biologickými vzorky noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech.
- Ujistěte se, že jste dobře obeznámeni s obsluhou přístroje QIASymphony SP. Instrukce naleznete v uživatelských příručkách dodávaných s vaším přístrojem.
Poznámka: Požadovaná konfigurace softwaru pro použití IVD je **Default Profile 1** (Výchozí profil 1).
- Před zahájením postupu si prostudujte část „Principy postupu“.
- Ujistěte se, že jste dobře obeznámeni s listem protokolu a seznamem laboratorního vybavení (naleznete je v záložkách Product Resources (Produktové zdroje) a Resources (Zdroje) na stránkách produktu na adrese www.qiagen.com a www.PreAnalytiX.com, v daném pořadí).
- Vyhněte se prudkému třepání kazetou RC, jinak by se mohla vytvořit pěna, která může vést k problémům s detekcí hladiny tekutiny.

- Krev je nutné odebrat do zkumavek PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD; PreAnalytiX, kat. č. 768165). Pokyny k odběru krve a manipulaci s ní a ke zpracování plazmy naleznete v návodu k použití zkumavek, který je k dispozici na záložce **Product Resources** (Produktové zdroje) a Resources (Zdroje) na stránce produktu na adrese www.qiagen.com nebo www.PreAnalytiX.com, v daném pořadí.

Co je třeba udělat, než začnete

- Před zahájením postupu ověřte, že jsou magnetické částice plně resuspendované. Před prvním použitím vaničku s magnetickými částicemi důkladně vortexujte po dobu nejméně 3 minut.
- Ověřte, že propichovací víčko je nasazeno na kazetě RC a že víčko z vaničky s magnetickými částicemi bylo sejmuto, nebo, pokud používáte kazetu RC, která již byla částečně využita, ověřte, že byly opětovně použitelné uzávěrací proužky odlepeny.
- Proteináza Proteinase K není součástí kazety RC, ale musí ji zajistit uživatel (zásuvka na vzorky, drážka A, pozice 1 a/nebo 2). Zajistěte, aby byl k dispozici správný objem proteinázy Proteinase K.

Sada QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit obsahuje roztok proteinázy Proteinase K připravený k okamžitému použití. Proteinázu Proteinase K lze skladovat při pokojové teplotě (15–25 °C). Pro dlouhodobém skladování doporučujeme uchovávat injekční lahvičky s enzymem proteinázy Proteinase K při teplotě 2–8 °C.

Číslo vzorku	PAXcircDNA_2400/PAXcircDNA PrimaryTube_2400* (µl)	PAXcircDNA_4800/PAXcircDNA PrimaryTube_4000* (µl)
8	1980	2860
24	3740	6380
48	6380	11660†
96	11660†	23320†

* Pro každý vzorek se vyžaduje 110 µl (na 2 400 µl plazmy) nebo 220 µl (na 4 800 / 4 000 µl plazmy), plus další prázdný objem 1 100 µl [(n × 110 nebo 220 µl) + 1 100 µl].

† Pokud je zapotřebí více než 11 660 µl, použijte druhou zkumavku (Corning, kat. č. 352051). Pro druhou zkumavku je požadován další prázdný objem 1 100 µl.

Poznámka: Zkumavky obsahující proteinázu Proteinase K jsou umístěny v nosiči zkumavek. Nosiče zkumavek obsahující proteinázu Proteinase K musí být umístěny na pozicích 1 nebo 2 ve slotu A zásuvky „Sample“ (Vzorek). Na proteinázu K doporučujeme použít polystyrenové zkumavky o objemu 14 ml a rozměrech 17 × 100 mm, s kulatým dnem (Corning, kat. č. 352051).

- Pokud jsou vzorky označeny čárovým kódem, orientujte vzorky v nosiči zkumavek tak, aby čárové kódy byly obráceny ke čtečce čárových kódů na levé straně přístroje QIASymphony SP.
- Informace o zkumavkách na vzorky a minimálních objemech vzorků kompatibilních s protokoly naleznete v příslušném seznamu laboratorního vybavení, který je k dispozici v záložkách Product Resources (Produktové zdroje) a Resources (Zdroje) na stránkách produktu na adrese www.qiagen.com a www.PreAnalytiX.com, v daném pořadí.

Protokol: Automatická purifikace ccfDNA na přístroji QIASymphony SP

Podrobné informace ke každému protokolu, včetně objemů a zkumavek, jsou uvedeny v listu protokolu a seznamu laboratorního vybavení, které naleznete v záložkách Product Resources (Produktové zdroje) a Resources (Zdroje) na stránkách produktu na adrese **www.qiagen.com** a **www.PreAnalytiX.com**, v daném pořadí. Příprava materiálu vzorku (plazma získaná z lidské venózní plně krve odebrané do zkumavky PAXgene Blood ccfDNA Tube) je popsána v částech „Odběr a příprava vzorků“ a „Příprava materiálu vzorků“ této příručky a v návodu k použití zkumavky, který naleznete v záložce **Product Resources** (Produktové zdroje) a Resources (Zdroje) na stránce produktu na adrese **www.qiagen.com** nebo **www.PreAnalytiX.com**, v daném pořadí.

1. Zavřete všechny zásuvky a odsávací kryt.
2. Zapněte přístroj QIASymphony SP a vyčkejte, dokud se neobjeví obrazovka Sample Preparation (Příprava vzorku) a neskončí inicializační postup.
3. Vypínač je umístěn v levém spodním rohu přístroje QIASymphony SP.
4. Přihlaste se do přístroje.

Vložte požadovaný eluční stojánek do zásuvky „Eluate“ (Eluát).

Do „Elution slot 4“ (Eluční drážka 4) nevkládejte 96jamkovou destičku. Použijte drážku „Elution slot 1“ (Eluční drážka 1) s odpovídajícím chladicím adaptérem.

Když používáte 96jamkovou destičku, ověřte, že je správně orientovaná, protože nesprávné umístění může při pozdější analýze způsobit záměnu vzorků.

Při použití stojanu na eluční mikrozkušavky Elution Microtubes CL, odstraňte spodní část otáčením stojanu, dokud se spodní část neodpojí.

5. Ujistěte se, že je zásuvka „Waste“ (Odpad) správně připravená a proveďte kontrolu obsahu zásuvky „Waste“ (Odpad), včetně žlábků na špičky, stanice na parkování špiček, prázdné nádoby na kapalný odpad a prázdných jednotkových boxů. V případě potřeby vyměňte sáček na likvidaci špiček Tip Disposal Bag.

6. Vložte požadovanou kazetu (požadované kazety) RC a spotřební materiál do zásuvky „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotřební materiál).
7. Provedte kontrolu obsahu vloženého do zásuvky „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotřební materiál).
8. Umístěte vzorky do příslušného nosiče vzorků a vložte je do zásuvky „Sample“ (Vzorek).

Poznámka: Kromě běžného zpracování včetně přenosu plazmy do příslušné sekundární zkumavky (14 ml polystyrenová zkumavka Falcon® s kulatým dnem, rozměry 17 × 100 mm), umístěné do příslušného nosiče vzorků, umožňuje pracovní postup manipulace s odběrovou zkumavkou PAXgene Blood ccfDNA Tube extrakci ccfDNA přímo ze zkumavky PAXgene Blood ccfDNA Tube (10 ml zkumavka PAXgene Blood ccfDNA Tube, 16 × 100 mm). Další informace o manipulaci s odběrovou zkumavkou naleznete v listu protokolu, seznamu laboratorního vybavení a návodu k použití zkumavky, které najdete na záložce Product Resources (Produktové zdroje) a na záložce Resources (Zdroje) na stránce produktu na adrese www.qiagen.com, respektive www.PreAnalytiX.com.

9. Pomocí dotykové obrazovky zadejte požadované informace o každé zpracovávané sadě vzorků a o proteináze Proteinase K.

Zadejte následující informace:

- Informace o vzorku (v závislosti na použitých stojácích na vzorky vyberte BD #352051 FalconPP 17 × 100 nebo BD_#768165 PAXgene ccfDNA 16 × 100)
- Protokol, který bude spuštěn (Assay Control Set (Kontrolní souprava analýzy))
- Eluční objem a výstupní pozice

Po zadání informací o sadě se status změní z LOADED (NAPLNĚNO) na QUEUED (ZAŘAZENO). Jakmile je jedna sada zařazena, objeví se tlačítko Run (Spustit).

10. Umístěte proteinázu Proteinase K do příslušného nosiče vzorku na pozici 1 a 2 a vložte je do drážky A zásuvky „Sample“ (Vzorek).

11. Stisknutím tlačítka **IC** definujte proteinázu Proteinase K.
12. Stisknutím tlačítka Run (Cyklus) zahajte postup purifikace. Všechny kroky zpracování jsou plně automatizované. Na konci protokolu se status šarže změní z RUNNING (ZPRACOVÁVÁ SE) na COMPLETED (DOKONČENO).
13. Vyjměte eluční stojan obsahující purifikovanou ccfDNA ze zásuvky „Eluate“ (Eluát). Potvrďte odstranění elučního stojanu pomocí softwaru přístroje QIASymphony SP.
14. ccfDNA je připravena k použití nebo ji lze uložit při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu až 6 měsíců. Společnost QIAGEN doporučuje destičku s eluáty ze zásuvky „Eluate“ (Eluát) vyjmout ihned po skončení cyklu. V elučních destičkách ponechaných v přístroji QIASymphony SP po skončení cyklu může docházet ke kondenzaci nebo odpařování podle toho, jaká je teplota a vlhkost.

Poznámka: Pomocí funkce chlazení přístroje QIASymphony SP je možné nechat běžet cykly přes noc.

Magnetické částice se většinou nepřenášejí do eluátů. Pokud přesto dojde k přenosu, magnetické částice v eluátech většinu následných aplikací neovlivní.

Pokud bude třeba magnetické částice před následnými aplikacemi odstranit, zkumavky nebo destičky obsahující eluáty musejí být nejdříve vloženy do vhodného magnetu a eluáty přeneseny do čisté zkumavky (viz „Příloha: Kvantifikace ccfDNA“). Pro každou destičku s elučními zkumavkami je generován soubor s výsledky.

15. Pokud byly kazety RC použité pouze částečně, uzavřete je ihned po skončení cyklu protokolu pomocí dodávaných opětovně použitelných uzavíracích proužků, aby se zamezilo vypařování.

Poznámka: Další informace o skladování částečně použitých kazet RC naleznete v části „Skladování reagentů a manipulace s nimi“.

16. Použité zkumavky na vzorky a odpad zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy. Informace o bezpečnosti jsou uvedeny v části „Varování a bezpečnostní opatření“.

17. Vyčistěte přístroj QIASymphony SP.

Postupujte podle pokynů pro údržbu v uživatelských příručkách dodávaných s přístrojem. Dbejte na pravidelné čištění chráničků špiček; minimalizujete tím riziko zkřížené kontaminace.

18. Uzavřete zásuvky přístroje a vypněte přívod proudu k přístroji QIASymphony SP.

Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže sady QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit testována podle předem stanovených kritérií, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

Omezení

Funkční vlastnosti systému byla stanovena ve studiích hodnocení výkonnosti s purifikací ccfDNA z plazmy získané z lidské venózní plně krve odebrané do zkumavky PAXgene Blood ccfDNA Tube.

Charakteristiky funkčních vlastností sady QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit byly stanoveny pro 18S ribozomální a DYS14 Y-chromozomální fragmenty ccfDNA v plazmě.

Každý uživatel je zodpovědný za ověření funkčních vlastností systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích hodnotících funkční vlastnosti výrobků QIAGEN a PreAnalytiX.

Pro minimalizaci rizika negativního dopadu na diagnostické výsledky je zapotřebí používat pro aplikace v následných stupních analýzy odpovídající kontroly. Jakékoliv získané diagnostické výsledky se musejí interpretovat v kontextu ostatních klinických nebo laboratorních nálezů.

Návod na řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které by mohly nastat při práci se systémem. Kontaktní údaje a seznam často kladených otázek naleznete na stránce příslušného výrobku na adrese www.PreAnalytiX.com nebo www.qiagen.com.

Komentáře a návrhy	
Obecné pokyny k manipulaci	
a) Chybová zpráva zobrazená na dotykové obrazovce	Pokud se během protokolu objevila chybová zpráva, nahlédněte do uživatelské příručky dodávané s vaším přístrojem.
b) Různý objem eluátu po cyklech přes noc	Pro optimalizaci výkonosti sada QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit podporuje zpracování vzorků přes noc ochlazením eluátů na přístroji QIASymphony SP. Během dlouhého chlazení se objem eluátu může v závislosti na teplotě a vlhkosti v laboratoři měnit. Například pokud byl zvolený objem 60 µl při teplotě 15–25 °C a vlhkosti 30–60 %, může se objem po 12 hodinách skladování v přístroji pohybovat v rozmezí 50–85 µl.
Kryoprecipitáty po rozmrazení vzorků plazmy	
a) Kryoprecipitáty se tvoří v plazmě	Aby se zabránilo tvorbě kryoprecipitátů, lze plazmu rozmrazovat při teplotě 30 °C po dobu 30 minut namísto při pokojové teplotě. Nerozmrazujte při nižších teplotách (např. 4 °C). Po rozmrazení zkumavku vortexujte 30 sekund
b) Nízký výtěžek ccfDNA z plazmy po odstranění kryoprecipitátů	Plazmu za účelem odstranění kryoprecipitátů neodstřeďte, protože mohou obsahovat ccfDNA.
Nedostatečný objem plazmy ze zkumavek PAXgene Blood ccfDNA Tube	
a) Odebráno méně než 10 ml krve do zkumavky PAXgene Blood ccfDNA Tube	Zajistěte, aby bylo do zkumavky PAXgene Blood ccfDNA Tube odebráno 10 ml krve. Viz návod k použití zkumavky PAXgene Blood ccfDNA Tube.
b) Vysoká hladina buněčná frakce	Vysoká hladina buněčné frakce (hematokritu) v lidské plné krvi (např. nad 51 % u mužů nebo 47 % u žen) může vést ke snížení objemu plazmy.
c) Nízký výtěžek plazmy po centrifugaci	Na výtěžek plazmy mohou mít vliv delší doba skladování a transportu krve nebo jiné podmínky centrifugace, než je uvedeno.
Precipitát ve vaničce otevřené kazety s reagensy (Reagent Cartridge, RC) v sadě QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit	
a) Odpařování pufrů	Rozsáhlé vypařování může vést ke zvýšené koncentraci soli v pufrch. Kazetu RC zlikvidujte. Pokud je nepoužíváte při purifikaci, ujistěte se, že jste uzavřeli vaničky s pufrů částečně použitých kazet RC pomocí opětovně použitelných uzavíracích proužků.

Komentáře a návrhy	
b) Skladování kazet RC	Skladování kazet RC při teplotách pod 15 °C může vést k tvorbě precipitátů.
Nízký výtěžek ccfDNA	
a) Magnetické částice nebyly plně resuspendovány	Před zahájením postupu ověřte, že jsou magnetické částice plně resuspendované. Před použitím je minimálně 3 minuty vortexujte. Neúplné resuspendování může vést k chybám při pipetování.
b) Ucpávání pipetovací špičky v důsledku nerozpustného materiálu	Ze vzorků nebyl před začátkem postupu purifikace na přístroji QIASymphony SP odstraněn nerozpustný materiál.
c) Materiál vzorku obsahuje nízkou koncentrací ccfDNA	Vzhledem k velmi nízkému množství ccfDNA ve vzorcích plazmy může být měření koncentrace ccfDNA náročné v závislosti na použité metodě kvantifikace. Pro kontrolu koncentrace ccfDNA v eluátech se doporučuje použít citlivou qPCR.
d) Neúplné opětovné uzavření kazety RC	Výměna s okolním vzduchem může vést ke snížení stability pufrů, což vede ke snížení účinnosti extrakce ccfDNA u částečně použité kazety RC. Pokud je nepoužíváte při purifikaci, ujistěte se, že jste pečlivě uzavřeli vaničky s pufrů částečně použitých kazet RC pomocí opětovně použitelných uzavíracích proužků.
Nízká výkonnost ccfDNA v následných aplikacích	
a) Eluát zkoncentrovaný vakuovou centrifugací	Nekonzentrujte eluát vakuovou centrifugací (např. v přístroji SpeedVac® nebo podobném přístroji). To může vést k degradaci v důsledku vysokých teplot a koncentrovaných solí v eluátu, což může narušit následné aplikace.
b) Přenos kuliček	Magnetické částice se většinou nepřenášejí do eluátů. Pokud přesto dojde k přenosu, magnetické částice v eluátech většinu následných aplikací neovlivní. V případě, že jsou pro specifické následné analýzy potřeba velmi vysoká množství eluátů, lze eluáty odstředit a přenést do čisté zkumavky.

Komentáře a návrhy

Žádný/neúplný přenos vzorku

a)	Je vložen nesprávný objem vzorku pro standardní protokoly	Pokud je vložen menší objem vzorku, než je uvedeno, zvyšuje se riziko nejasného označení vzorku nebo nepřenesení vzorku (neplatné označení). Vložte správný objem vzorku, jak je popsáno v příslušném listu protokolu a seznamu laboratorního vybavení.
b)	Bublínky a/nebo pěna ve zkumavce se vzorkem	Bublínky nebo pěna ve vzorku a/nebo ve vstupní zkumavce se vzorkem mohou mít za následek nesprávnou detekci hladiny kapaliny a následný neúplný přenos vzorku. Odstraňte bublínky ze zkumavky se vzorkem.

Symboly

V návodu k použití anebo na obalu a značení se mohou objevit následující symboly. Další symboly jsou vysvětleny v části Obsah sady (strana 9).

Symbol	Definice symbolu
Σ <N>	Obsahuje dostatek reagensů pro <N> testů Označuje celkový počet testů IVD, které lze s IVD provést.
	Použijte do
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
	Označení CE Tento výrobek splňuje požadavky evropského nařízení 2017/746 pro diagnostické zdravotnické prostředky in vitro.
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu (tj. označení dílu)
	Součásti (tj. seznam dodávaných součástí)
	Obsahuje (obsah)
	Počet (tj. injekční lahvičky, lahvičky)
	Globální číslo obchodní položky (Global Trade Item Number, GTIN)
Rn	R označuje revizi návodu k použití (příručky) a n je číslo revize



Teplotní omezení



Výrobce



Viz návod k použití



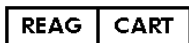
Upozornění



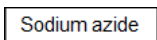
Proteinase K



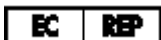
Číslo jamky (tj. jamky kazety RC)



Kazeta s reagenциemi



Azid sodný



Evropský autorizovaný zástupce podle nařízení (EU) 2017/746

Příloha: Kvantifikace ccfDNA

Vzhledem k velmi nízkým koncentracím ccfDNA v materiálech vzorků se měření DNA spektrofotometrem nedoporučuje. Pro stanovení koncentrace ccfDNA je třeba použít citlivou a přesnou kvantifikační analýzu založenou na fluorescenci anebo analýzu real-time PCR.

Pokud je třeba odstranit magnetické částice, zkumavku obsahující DNA vložte do vhodného magnetického separátoru (např. QIAGEN 12-Tube Magnet, kat. č. 36912) dokud nedojde k oddělení magnetických částic.

Pokud je DNA v mikrodestičkách, mikrodestičku vložte do vhodného magnetického separátoru (např. QIAGEN 96-Well Magnet Type A, kat. č. 36915), dokud nedojde k oddělení magnetických částic. Pokud není vhodný magnetický separátor dostupný, oddělte zbývající magnetické částice odstředěním zkumavky obsahující DNA v mikrocentrifuze plnou rychlostí po dobu 1 minuty.

Informace pro objednání

Produkt	Obsah	Kat. č.
PreAnalytiX		
QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) (192)	Obsahuje 2 kazety RC, zkumavky s proteinázou Proteinase K a příslušenství	768566
PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD)(100)	100 zkumavek: 16 × 100 mm, 1,5 ml aditiva, objem odebrané krve 10 ml	768165
QIAGEN		
QIASymphony SP instrument	QIASymphony modul pro přípravu vzorků, roční záruka na součásti a servis	9001297
Související výrobky QIAGEN		
Proteinase K (10 mL)	Lahvička, 1 × 10 ml	19134
Reagent Cartridge Holder (2)	Držák kazety RC pro použití s přístrojem QIASymphony SP	997008
Cooling Adapter, 2 mL, Qsym	Chladicí nástavec pro 2 ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem. Pro použití se zásuvkou „Eluate“ (Eluát) v přístroji QIASymphony SP	9020674
Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym	Chladicí nástavec pro stojánky EMT. Pro použití se zásuvkou „Eluate“ (Eluát) v přístroji QIASymphony SP	9020730
Cooling Adapter, Snap-Cap Microtube QIASymphony, Qsym	Chladicí adaptér pro 1,5 ml zkumavky Eppendorf® LoBind Snap Cap Safe-Lock. Pro použití se zásuvkou „Eluate“ (Eluát) v přístroji QIASymphony SP	9020731
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8jamkové kazety pro přípravu vzorků pro použití s přístrojem QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Kryty pro 8 tyčinek pro použití v přístroji QIASymphony SP	997004

Produkt	Obsah	Kat. č.
Filter-Tips, 200 µL (1024)	Špičky Disposable Filter-Tips, ve stojanech; (8 × 128). Pro použití s přístroji QIAcube® a QIASymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µL, Qsym SP (1024)	Špičky Disposable Filter-Tips, ve stojanech; (8 × 128). Pro použití s přístrojem QIASymphony SP/AS	997024
Tip Disposal Bags (15)	Odpadní sáčky na špičky Tip Disposal Bag pro použití s přístrojem QIASymphony SP	9013395
12-Tube Magnet	Magnet pro separaci magnetických částic ve zkumavkách 12 × 1,5 ml nebo 2 ml	36912
96-Well Magnet Type A	Magnet pro separaci magnetických částic v jamkách destiček s 96 jamkami, 2 × mikrotitrační destičky 96-Well Microplates FB	36915
Reuse Seal Set (20)	Opětovně použitelné uzavírací sady Reuse Seal Set pro uzavření částečně použitých kazet RC QIASymphony	997006
Elution Microtubes CL (24 × 96)	Nesterilní polypropylenové zkumavky (maximální kapacita 0,85 ml, kapacita pro uchování méně než 0,7 ml, eluční kapacita 0,4 ml); 2 304 ve stojancích po 96; včetně stripů s víčky	19588
Caps for Elution Microtubes (50 × 8)	Víčka pro eluční mikrozkušavky (50 × 8)	19591
14 mL Falcon Tube	Polystyrenová zkumavka s kulatým dnem o rozměru 17 × 100 mm, používaná jako nosič vzorku pro přístroj QIASymphony SP	Corning, 352051

Historie revizí dokumentu

Revize	Popis
R1, květen 2021	První vydání
R2, květen 2022	V některých výskytech odstraněna závorka „(CE-IVD)“. Aktualizována tabulka Obsah sady. Připojena webová stránka www.PreAnalytiX.com , kde lze nalézt související zdroje. V oddíle Informace o bezpečnosti byly „vzorky“ upřesněny na „vzorky krve“. V oddíle Informace o bezpečnosti změněno „Vzorky a odpad z analýzy zlikvidujte“ na „Biologicky nebezpečné materiály a odpad ze sad“. Aktualizované části „A) Příprava plazmy z krve pro standardní protokoly“ a „B) Výroba plazmy z krve pro manipulaci s odběrovou zkumavkou na přístroji QIASymphony SP“.
R3, únor 2023	Adresa společnosti PreAnalytiX GmbH změněna z ulice „Feldbachstrasse“ na „Garstligweg 8“. Aktualizace oddílu Bezpečnostní opatření. V oddíle Informace o bezpečnosti byly přidány informace pro případ nouze. Oprava katalogového čísla proteinázy Proteinase K (100 ml) v oddíle Informace pro objednání. Změny v rozvržení a úpravách.

Poznámky

Poznámky



Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příslušné příručce pro sadu PreAnalytiX[®] nebo QIAGEN[®], případně v uživatelské příručce. Příručky a uživatelské návody pro sady PreAnalytiX a QIAGEN jsou k dispozici na stránkách www.qiagen.com anebo si je lze vyžádat u Technických služeb QIAGEN nebo lokálního distributora.

Více informací naleznete na webu: www.PreAnalytiX.com

HB-2866-003 02/2023

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company