

Veljača 2023.

Upute za uporabu kompleta QIASymphony® PAXgene® Blood ccfDNA Kit (Priručnik)



192

Inačica 1



Za in vitro dijagnostičku uporabu



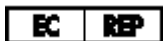
768566



PreAnalytiX GmbH

Garstligweg 8, 8634 Hombrechtikon, Švicarska

1130770HR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NJEMAČKA

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

8634 Hombrechtikon

Švicarska

www.PreAnalytiX.com

Zaštitni znakovi: PAXgene®, PreAnalytiX® (PreAnalytiX GmbH)
QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, QIASymphony® (Grupa QIAGEN)
BD™ (Becton Dickinson and Company)
Corning®, Falcon® (Corning, Inc.)
Eppendorf® (Eppendorf AG)
SpeedVac® (Thermo Fisher Scientific ili njegova pridružena društva).

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

1130770HR HB-2866-003

© 2023 PreAnalytiX GmbH. PreAnalytiX, logotip PreAnalytiX i svi drugi zaštitni znakovi u vlasništvu su društva PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH, osim ako nije drukčije navedeno.

Ugovor o ograničenoj licenciji za komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit

Uporabom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit 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 u kompletu. PreAnalytiX® u okviru svojeg intelektualnog vlasništva ne daje nikakvu licenciju za uporabu ili ugrađivanje komponenata ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom kompletu, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovom priručniku i drugim protokolima dostupnima na web-mjestu **www.qiagen.com** i **www.PreAnalytiX.com**.
2. Osim izričito navedenih licencija, društvo PreAnalytiX ne jamči da ovaj komplet i/ili njegova uporaba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj potrošni materijal i njegove komponente licencirani su za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, prerađivati niti preprodavati.
4. Društvo PreAnalytiX posebno se odriče svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik kompleta potvrđuju da neće poduzeti niti dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja prethodno 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 kompletom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na **www.qiagen.com** i **www.PreAnalytiX.com**.

Distributeri proizvoda društva PreAnalytiX

Proizvode društva PreAnalytiX za PreAnalytiX proizvodi i distribuira QIAGEN i BD.

Sadržaj

Sadržaj.....	3
Predviđena uporaba	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
Prikupljanje i priprema ispitaka.....	16
Postupak.....	20
Pregled: automatizirano pročišćavanje ccfDNA na instrumentu QIASymphony SP	20
Pregled protokola.....	25
Protokol: automatizirano pročišćavanje ccfDNA na instrumentu QIASymphony SP	28
Kontrola kvalitete	32
Ograničenja.....	32

Vodič za rješavanje problema	33
Simboli.....	35
Dodatak: kvantifikacija ccfDNA	37
Informacije za naručivanje.....	38
Povijest revizija dokumenta.....	40

Predviđena uporaba

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

Komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit primjenjuje tehnologiju magnetskih čestica za automatiziranu izolaciju i pročišćavanje ccfDNA iz humane plazme.

Komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit namijenjen je za *in vitro* dijagnostičku uporabu i to profesionalnim korisnicima, kao što su tehničari i liječnici obučeni za tehnike molekularne biologije.

Predviđeni korisnik

Ovaj komplet namijenjen je za profesionalnu uporabu.

Proizvod smije upotrebljavati samo osoblje koje je primilo posebne upute i obučeno je za tehnike molekularne biologije te je upoznato s navedenom tehnologijom.

Opis i načelo

Sažetak i objašnjenje

Cirkulirajuća DNK bez stanica (circulating cell-free DNA, ccfDNA) u plazmi je prisutna obično u obliku kratkih fragmenata (< 1000 bp). Koncentracija ccfDNA u plazmi obično je niska (može se kretati od 1 do 100 ng/ml) i u velikoj mjeri varira od osobe do osobe. Epruveta PreAnalytiX PAXgene Blood ccfDNA Tube s oznakom CE u kombinaciji s kompletom QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit omogućava standardizirani tijek rada za prikupljanje, pohranu i transport krvi; stabilizaciju DNK u zatvorenoj epruveti; i naknadnu izolaciju i pročišćavanje ccfDNA iz humane plazme s pomoću instrumenta QIAGEN® QIASymphony SP.

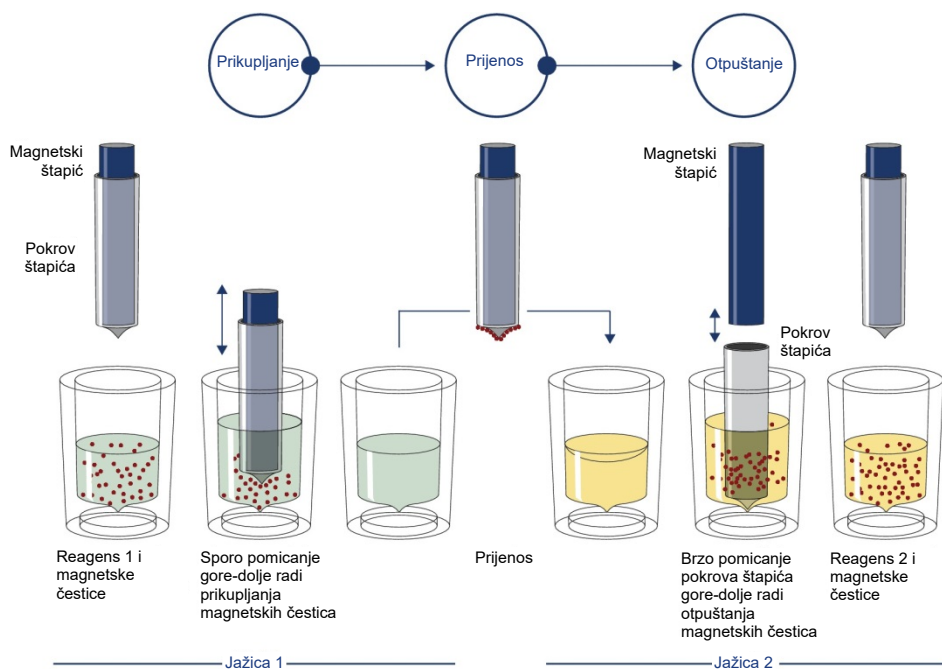
Na instrumentu QIASymphony SP postoje protokoli za ekstrakciju ccfDNA iz plazme volumena od 2,4 ml i 4,8 ml dobivene dvostrukim centrifugiranjem u epruvetama PAXgene Blood ccfDNA Tube. Plazma se prenosi i obrađuje u sekundarnoj epruveti na instrumentu QIASymphony SP.

Kao druga mogućnost, za ulazni volumen plazme od 2,4 ml i 4 ml na instrumentu QIASymphony SP postoje protokoli za rukovanje primarnom epruvetom. U tom slučaju nema potreba za korakom u kojem se obavlja drugo centrifugiranje niti za prijenosom plazme u sekundarnu epruvetu.

Tehnologija magnetskih čestica kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit omogućava pročišćavanje visokokvalitetne ccfDNA u kojoj nema proteina, nukleaza ni drugih nečistoća. Instrument QIASymphony SP izvodi sve korake postupka pročišćavanja. U jednoj obradi obrađuje se do 96 uzoraka, u serijama od 24 uzorka. Informacije o izolaciji genomske DNK (gDNK) iz frakcije nukleiranih stanica krvi prikupljene u epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube na instrumentu QIASymphony SP potražite u uputama navedenima u uputama za uporabu epruveta PAXgene Blood ccfDNA Tube (www.PreAnalytiX.com).

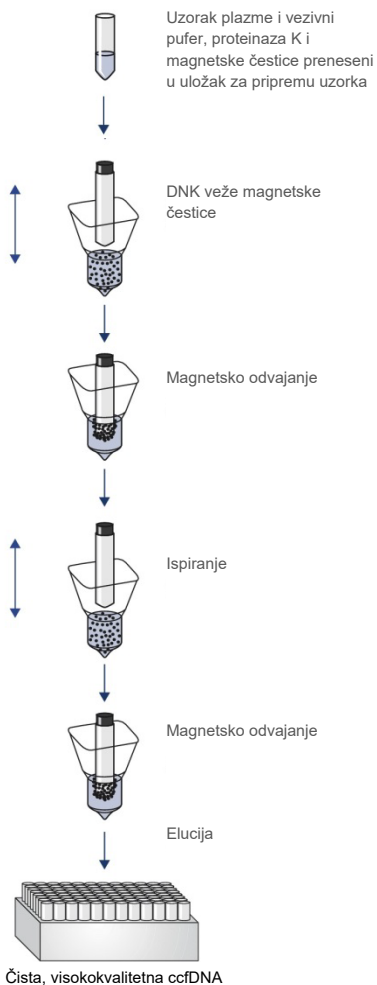
Načela postupka

Tehnologija instrumenta QIASymphony SP objedinjuje brzinu i učinkovitost pročišćavanja nukleinske kiseline na temelju anionske izmjene s praktičnim rukovanjem magnetskim česticama (slika 1). Postupak pročišćavanja osmišljen je tako da osigurava sigurno i obnovljivo rukovanje potencijalno infektivnim uzorcima, a sastoji se od 3 koraka: vezanje, ispiranje i elucija (slika 2). Korisnici mogu birati između različitih ulaznih volumena uzoraka.



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

Komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA



Slika 2. Koraci za ekstrakciju ccfDNA s pomoću kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit. Fragmenti ccfDNA izoliraju se iz plazme dobivene iz humane venske pune krvi prikupljene u epruvetu PAXgene Blood ccfDNA Tube. Tijekom prvog koraka obrade proteinaza K razgrađuje proteine plazme, a ccfDNA veže se za površinu magnetskih čestica. Tri koraka ispiranja jamče uklanjanje kontaminanata. Na kraju se ccfDNA eluira s magnetskih čestica i spremna je za uporabu u postupcima daljnje obrade.

Uključeni materijali

Sadržaj kompleta

Komplet OIA Symphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) Kataloški br. Broj reakcija		(192) 768566 192		
Kratice	Naziv	Količina	Aktivni sastojci	Koncentracija [%]**
RC	Reagent cartridge (Uložak reagensa) [†]	2	Neionski deterdžent Magnetska čestica s anionskom izmjenom NaOH Etanol	≥ 0,5 – < 10 [w/w] – ≥ 0,05 – < 0,1 [w/w] ≥ 70 – < 90 [v/v]
PROTK	Proteinase K (Proteinaza K) [†]	5 × 10 ml	Proteinaza K	≥ 1 – < 3 [w/w]
PL	Piercing lid (Poklopac za bušenje)	2	–	–
RSS	Komplet Reuse Seal Set [†]	2	–	–
	Elution Microtubes CL, racked (Elution Microtubes CL, na nosaču) [#]	2	–	–
	Caps for Elution Microtubes (Čepovi za Elution Microtubes) [#]	1 × (55 × 8)	–	–
	Upute za uporabu (Priručnik)	1	–	–
	PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool	1	–	–

* Sadržava natrijev azid kao konzervans.

[†] Popis simbola i definicija potražite na stranici 35.

[†] Komplet Reuse Seal Set sadržava 8 traka za zatvaranje radi ponovne uporabe.

[#] Može se i zasebno nabaviti, pogledajte Informacije za naručivanje.

** Maksimalna koncentracija u jednoj jažici.

Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

Pri radu s kemikalijama i biološkim uzorcima uvijek se pridržavajte univerzalnih mjera opreza i nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, jednokratne rukavice i zaštitne naočale u skladu s pravilima i postupcima vaše ustanove. Dodatne informacije 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 odnosno 997024)
- Tip Disposal Bags (QIAGEN, kat. br. 9013395)
- Epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) (PreAnalytiX, kat. br. 768165)
- Epruvete za uzorke. Kompatibilne oblike primarnih i sekundarnih epruveta potražite na popisu laboratorijske opreme koji možete pronaći na karticama Product Resource (Resursi za proizvod) i Resources (Resursi) na stranicama proizvoda na web-mjestu **www.qiagen.com** odnosno **www.PreAnalytiX.com**.
- Kompatibilne oblike epruveta za eluciju potražite na popisu laboratorijske opreme koji možete pronaći na karticama Product Resource (Resursi za proizvod) i Resources (Resursi) na stranicama proizvoda na web-mjestu **www.qiagen.com** odnosno **www.PreAnalytiX.com**.

Oprema*

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

* Prije uporabe provjerite jesu li instrumenti provjereni i kalibrirani prema preporukama proizvođača.

Upozorenja i mjere opreza

Za in vitro dijagnostičku uporabu.

Prije uporabe kompleta pažljivo pročitajte sve upute.

Imajte na umu da kupci u Europskoj uniji ozbiljne štetne događaje koji su nastali u vezi s uređajem moraju prijaviti proizvođaču i nadležnom tijelu države članice u kojoj se korisnik i/ili pacijent nalaze.

Sigurnosne informacije

Pri radu s kemikalijama i biološkim uzorcima uvijek se pridržavajte univerzalnih mjera opreza i nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, jednokratne rukavice 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 PreAnalytiX i komponentu kompleta.

- Sve kemikalije i biološki materijali potencijalno su opasni. Ispitci krvi i uzorci potencijalno su infektivni te se njima mora rukovati kao biološki opasnim materijalom.
- Biološki opasne materijale i otpad kompleta odlažite u skladu s lokalnim sigurnosnim postupcima.

Informacije za slučaj nužde

CHEMTREC

SAD i Kanada 1-800-424-9300

Izvan SAD-a i Kanade +1 703-527-3887

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-postotnim (v/v) natrijevim hipokloritom (izbjeljivač).

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.

Proteinaza K



Sadržava: proteinazu 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 nesrećenog na svježi 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 skinuti svu zagađenu odjeću. Isprati kožu vodom/tušem. Odmah nazvati centar za kontrolu otrovanja ili liječnika. Čuvati 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 treba čuvati u uspravnom položaju na sobnoj temperaturi (15 °C – 25 °C). Magnetske čestice u ulošcima reagensa (reagent cartridge, RC) ostaju aktivne kada se čuvaju unutar tog temperaturnog raspona.

Napomena: na naljepnici na kutiji kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit naveden je rok trajanja kompleta. Rok trajanja odnosi se na uložak reagensa.

Ne upotrebljavajte komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit nakon isteka roka trajanja.

Komponente kompleta

Komplet QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit sadržava otopinu proteinaze K spremnu za uporabu koja se može čuvati na sobnoj temperaturi (15 °C – 25 °C).

RC-ove nemojte čuvati na temperaturama nižima od 15 °C.

Otvoreni RC-ovi iz kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit mogu se čuvati na sobnoj temperaturi (15 °C – 25 °C) do 4 tjedna, čime se omogućavaju ekonomična ponovna uporaba reagensa i fleksibilnija obrada uzoraka, ako se nakon uporabe na odgovarajući način zatvore. Ako se RC djelomično iskoristi, vratite pokrov spremnika s magnetskim česticama i zatvorite RC isporučenim trakama za zatvaranje radi ponovne uporabe odmah nakon završetka postupka protokola kako biste spriječili isparavanje.

Kako bi se izbjeglo isparavanje reagensa, RC treba biti otvoren najviše 15 sati (uključujući vrijeme obrade) na maksimalnoj temperaturi okoline od 32 °C. Nepravilno skladištenje komponenata kompleta može dovesti do bržeg starenja pufera.

Obrada serija s malim brojem uzoraka (< 24) dovest će do duljeg trajanja otvorenosti RC-a i većih potrebnih volumena pufera, što potencijalno može smanjiti ukupan broj priprema uzoraka moguć po ulošku.

Izbjegavajte izlaganje RC-ova UV svjetlu (npr. koje se upotrebljava za dekontaminaciju) jer izlaganje može ubrzati starenje RC-ova i pufera.

Treba 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.

Prikupljanje i priprema ispitaka

Postupak pročišćavanja optimiziran je za uporabu s plazmom dobivenom iz krvi prikupljene u epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube. Informacije o prikupljanju krvi, rukovanju tim epruvetama i pripremi plazme potražite u uputama za uporabu epruveta PAXgene Blood ccfDNA Tube, koje možete pronaći na karticama Product Resource (Resursi za proizvod) i karticama Resources (Resursi) na stranicama proizvoda na web-mjestu www.qiagen.com odnosno www.PreAnalytiX.com.

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

A) Priprema plazme iz krvi za standardne protokole

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

Napomena: za najbolji radni učinak uzoraka pohranjenih u hladnjaku prije centrifugiranja ponovno promiješajte uzorak tako da ga preokrenete tri puta i 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 °C – 25 °C) u trajanju od 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 potrebni volumen plazme (pogledajte odjeljak „Volumen uzorka“, stranica 20) u polistirensku epruvetu sa zaobljenim dnom od 14 ml, veličine 17 mm x 100 mm, pazeći pritom da ne ometate preostali talog krvnih stanica, ako postoji.
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 njihovoj površini tijekom pipetiranja. Pjena ili mjehurići zraka na uzorcima mogu dovesti do pipetiranja pogrešnog volumena uzorka.

Napomena: nakon prijenosa plazme u sekundarnu epruvetu ccfDNA stabilna je u plazmi pri 15 °C – 25 °C do 3 dana ili pri 2 °C – 8 °C do 7 dana. Za dulje čuvanje preporučujemo zamrzavanje alikvota na –20 °C ili –80 °C.

Napomena: kada se upotrebljavaju prethodno pohranjeni uzorci plazme (npr. pohranjeni na 2 °C – 8 °C ili zamrznuti na –20 °C ili –80 °C), prije pokretanja postupka treba ih izjednačiti sa sobnom temperaturom (15 °C – 25 °C); za zamrznute uzorke pogledajte odjeljak „C) Zamrzavanje i odmrzavanje obrađenih uzoraka plazme iz epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube“.

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

1. Centrifugirajte epruvetu PAXgene Blood ccfDNA Tube na sobnoj temperaturi (15 °C – 25 °C) u trajanju od 15 minuta pri 3000 × 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 najbolji radni učinak uzoraka pohranjenih u hladnjaku prije centrifugiranja ponovno promiješajte uzorak tako da ga preokrenete tri puta i 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 s granicom plazma/stanica. Plave linije označavaju je li razina plazme dovoljna za protokol rukovanja primarnom epruvetom od 2,4 ml 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 potrebno je minimalno 3,4 cm.

Napomena: u slučaju da nije došlo do jasnog odvajanja frakcije plazme i stanica ili su se faze slučajno izmiješale nakon uklanjanja iz centrifuge, centrifugiranje treba ponoviti.

Napomena: provjerite je li došlo do jasnog odvajanja prije postavljanja epruvete na instrument.

3. Uklonite čep Hemogard s epruveta PAXgene Blood ccfDNA Tube prije postavljanja na instrument QIASymphony SP radi izravne ekstrakcije ccfDNA.

Napomena: skidanje čepa epruvete i rukovanje otvorenim epruvetama treba obavljati pažljivo kako bi se smanjio potencijalni rizik od prolivanja uzorka, križne kontaminacije između epruveta i izloženosti krvi.

4. Otvorene epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube 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 obrađenih uzoraka plazme iz epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube

1. Za zamrzavanje, prenesite plazmu u prikladne epruvete (npr. kriogene bočice) postavljene na odgovarajući nosač.
2. Zamrznite i pohranite plazmu na -20°C . Za pohranu na temperaturi nižoj od -20°C najprije zamrznite uzorke plazme na -20°C na najmanje 24 h, a zatim ih prenesite na -80°C .
3. Odmrznite plazmu na sobnoj temperaturi (15°C – 25°C).

Napomena: ne odmrzavajte na niskim temperaturama (npr. 4°C).

4. Ako se u plazmi formiraju krioprecipitati, nakon odmrzavanja miješajte epruvetu 30 s na vrtložnoj miješalici i upotrijebite uzorak za postupak izolacije ccfDNA na instrumentu QIASymphony SP bez daljnje obrade.

Napomena: ne preporučuje se centrifugiranje plazme radi uklanjanja krioprecipitata jer oni mogu sadržavati ccfDNA.

Napomena: da biste spriječili formiranje krioprecipitata, plazmu umjesto na sobnoj temperaturi možete odmrzavati na 30°C u trajanju od 30 min.

Postupak

Pregled: automatizirano pročišćavanje ccfDNA na instrumentu QIASymphony SP

Instrument QIASymphony SP omogućava laku i praktičnu automatiziranu pripremu uzoraka. Uzorci, reagensi i potrošni materijal te eluati razdvajaju se u različitim ladicama. Prije obrade jednostavno postavite uzorke, reagense isporučene u posebnim ulošcima i potrošni materijal prethodno postavljen na nosače u odgovarajuću ladicu. Pokrenite protokol, a nakon obrade izvadite pročišćenu ccfDNA iz ladice „Eluate“ (Eluat). Upute za rad potražite u korisničkim priručnicima isporučenima s instrumentom.

Napomena: opcionalno održavanje nije obvezno da bi instrument funkcionirao, ali se izričito preporučuje kako bi se smanjio rizik 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 ml odnosno 0,5 ml, što znači da se mora osigurati unos uzorka od minimalno 2,8 ml i 5,3 ml. Ako je dostupan volumen plazme manji od 2,8 ml ili 5,3 ml, **način Less Sample** (Manji uzorak), integrirana funkcija protokola, automatski omogućava prijenos manjih volumena plazme od onih navedenih. U ovom slučaju instrument prenosi manju količinu uzorka. Razlika pipetiranih volumena plazme zabilježiti će se u datoteci rezultata. Osim toga, odgovarajući uzorci označavaju se kao **nejasno** (kod pogreške 140043, **načina Enable Less Sample** (Omogućiti manji uzorak)). Minimalni ulazni volumeni plazme za omogućavanje **načina Less Sample** (Manji uzorak) iznose 1,6 ml i 4,1 ml. Ako se isporučiti manji volumen uzorka, uzorci se neće obraditi i bit će označeni s **nevažće**. Za tijek rada rukovanja primarnom epruvetom odgovarajući volumen uzorka osigurava se primjenom alata PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool isporučenog u kompletu (opisan u odjeljku „Priprema materijala uzorka“ na stranici 24).

Postavljanje RC-ova u ladicu „Reagents and Consumables“ (Reagensi i potrošni materijali)

Reagensi za pročišćavanje ccfDNA nalaze se u inovativnom ulošku reagensa (Reagent Cartridge, RC) (slika 3). Svaki spremnik RC-a sadržava određeni reagens, kao što su magnetske čestice, vezivni pufer, pufer za ispiranje ili pufer za eluciju. Djelomično iskorišteni RC-ovi mogu se ponovno zatvoriti trakama za zatvaranje radi kasnije ponovne uporabe, čime se izbjegava stvaranje otpada zbog preostalih reagensa na kraju postupka pročišćavanja.



Slika 3. Uložak reagensa (Reagent Cartridge, RC) QIAasymphony. RC sadržava sve reagense potrebne za postupak protokola.

Prije nego što započnete postupak, provjerite jesu li magnetske čestice potpuno resuspendirane. Izvadite spremnik s magnetskim česticama iz okvira RC-a, energično ga miješajte na vrtložnoj miješalici barem 3 minute, a zatim ga prije prve uporabe vratite u okvir RC-a.

Napomena: magnetske čestice mogu promijeniti boju. To ne utječe na radni učinak.

Stavite RC u držač RC-a. Prije prve uporabe RC-a postavite poklopac za bušenje povrha RC-a (slika 3).

Napomena: poklopac za bušenje oštar je. Budite oprezni kada ga postavljate na RC. Pazite da poklopac za bušenje na RC postavite u ispravnom smjeru.

Nakon skidanja pokrova spremnika s magnetskim česticama RC se postavlja u ladicu „Reagents and Consumables“ (Reagensi i potrošni materijali).

Djelomično iskorišteni RC-ovi mogu se čuvati dok ponovno ne budu potrebni (pogledajte „Pohrana i rukovanje reagensima“ na stranici 14).

Napomena: morate dodati proteinazu K (pogledajte „Postupci koje treba napraviti prije započinjanja“ na stranici 26).

Napomena: pripazite da se ne izmiješaju serije RC-ova, spremnika s magnetskim česticama i bočica s proteinazom iz različitih serija kompleta.

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

Ulošci za pripremu reagensa, 8-Rod Covers (oboje prethodno postavljeni na nosače u kutijama jedinica) i jednokratni vršci s filtrima (vršci od 200 µl isporučeni u plavim nosačima, vršci od 1500 µl isporučeni u crnim nosačima) postavljaju se u ladicu „Reagents and Consumables“ (Reagensi i potrošni materijali).

Napomena: prije nego što postavite kutije jedinica u ladicu „Reagents and Consumables“ (Reagensi i potrošni materijali), provjerite jesu li uklonjeni pokrovi kutija jedinica.

Napomena: vršci imaju filtre koji pomažu u sprječavanju križne kontaminacije.

Utori na nosačima vršaka na radnoj površini instrumenta QIASymphony SP mogu se napuniti bilo kojom vrstom nosača vršaka. Instrument QIASymphony SP identificirat će vrstu vršaka postavljenih tijekom skeniranja uzoraka.

Napomena: nemojte ponovno puniti nosače vršaka ili kutije jedinica za uloške za pripremu uzoraka ili 8-Rod Covers prije nego što pokrenete drugi postupak protokola. Instrument QIASymphony SP može upotrijebiti djelomično iskorištene nosače vršaka i kutije jedinica.

Informacije o naručivanju plastične opreme potražite na stranici 38.

Punjenje ladice „Waste“ (Otpad)

Ulošci za pripremu uzoraka i 8-Rod Covers korišteni tijekom postupka ponovno se postavljaju na nosače u praznim kutijama jedinica u ladici „Waste“ (Otpad). Provjerite ima li u ladici „Waste“ (Otpad) dovoljno praznih kutija jedinica za plastični otpad nastao tijekom postupka protokola.

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

Na prednju stranu ladice „Waste“ (Otpad) mora se pričvrstiti vrećica za iskorištene vrške s filtrima.

Napomena: sustav ne provjerava je li postavljena vrećica za odlaganje vršaka. Prije nego što započnete postupak protokola, provjerite je li vrećica za odlaganje vršaka pravilno pričvršćena. Dodatne informacije potražite u korisničkim priručnicima isporučenima s instrumentom. Ispraznite vrećicu za vrške nakon obrade najviše 96 uzoraka kako biste spriječili zaglavljivanje vršaka.

Spremnik za otpad prikuplja tekući otpad koji nastane tijekom postupka pročišćavanja. Ladica „Waste“ (Otpad) može se zatvoriti samo ako je spremnik za otpad na svojem mjestu. Tekući otpad odložite u skladu s lokalnim sigurnosnim i propisima za zaštitu okoliša. Nemojte autoklavirati napunjenu bocu za otpad. Ispraznite bocu za otpad nakon obrade najviše 96 uzoraka.

Punjenje ladice „Eluate“ (Eluat)

Postavite potrebni nosač za eluciju u ladicu „Eluate“ (Eluat). Budući da dugotrajna pohrana eluata u ladici „Eluate“ (Eluat) može dovesti do isparavanja ili kondenzacije, mora se upotrijebiti položaj za hlađenje. S odgovarajućim adapterom za hlađenje upotrebljavajte samo „Elution slot 1“ (Otvor za eluciju 1).

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

* To je minimalni dostupni volumen eluata u epruveti za konačnu eluciju za nosač QIAGEN EMT rack (kat. br. 19588) i epruvete Sarstedt screw cap tube od 1,5 ml (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.

Skeniranje sadržaja

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

Priprema materijala uzorka

Pogledajte „Prikupljanje i priprema ispitaka“, stranica 16.

Čuvanje ccfDNA

Nakon pripreme uzorka, eluati ccfDNA mogu se pohraniti na -20°C ili -80°C . Zamrznuti eluati ne smiju se odmrzavati više od tri puta. Najnovije informacije o stabilnosti ccfDNA u eluatima potražite na stranici proizvoda na web-mjestu www.qiagen.com ili www.PreAnalytiX.com.

Pregled protokola

Tablica 1. Pregled protokola

Uzorak	Obrada epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube	Ulazni volumen uzorka (uklj. prazan volumen) (ml)	Volumen uzorka koji se upotrebljava za ekstrakciju ccfDNA (ml)	Volumen elucije (µl)	Protokol instrumenta QIASymphony SP
Plazma dobivena iz humane venske pune krvi prikupljena u epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube	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 u 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, jednokratne rukavice i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheets, SDS).
- Obavezno se upoznajte s radom instrumenta QIASymphony SP. Upute za rad potražite u korisničkim priručnicima isporučenima s instrumentom.
Napomena: Potrebna konfiguracija softvera za IVD uporabu jest **Zadani profil 1**.
- Prije nego što započnete s postupkom, pročitajte odjeljak „Načela postupka“.
- Obavezno se upoznajte s listom protokola i popisom laboratorijske opreme (možete ih pronaći na karticama Product Resource (Resursi za proizvod) i karticama Resources (Resursi) na stranicama proizvoda na web-mjestu **www.qiagen.com** odnosno **www.PreAnalytiX.com**).
- Izbjegavajte energično protresanje RC-a; u protivnom bi moglo doći do formiranja pjene, što može dovesti do problema s detekcijom razine tekućine.

- Krv se mora prikupiti u epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD; PreAnalytiX, kat. br. 768165). Upute za prikupljanje krvi, rukovanje krvlju i obradu plazme potražite u uputama za uporabu epruveta koje možete pronaći na kartici **Product Resources** (Resursi za proizvod) i kartici Resources (Resursi) na stranici proizvoda na web-mjestu www.qiagen.com odnosno www.PreAnalytiX.com.

Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Prije nego što započnete postupak, provjerite jesu li magnetske čestice potpuno resuspendirane. Prije prve uporabe energično na vrtložnoj miješalici najmanje 3 minute miješajte spremnik koji sadržava magnetske čestice.
- Provjerite je li poklopac za bušenje postavljen na RC i je li uklonjen poklopac spremnika s magnetskim česticama ili, ako upotrebljavate djelomično iskorišteni RC, provjerite jesu li skinute trake za zatvaranje radi ponovne uporabe.
- Proteinaza K ne nalazi se u RC-u, već je mora osigurati korisnik (ladica za uzorke, utor A, položaj 1 i/ili 2). Provjerite je li dostupan odgovarajući volumen proteinaze K.

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

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

* 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 proteinazu K postavljaju se na nosač epruveta. Nosač epruveta s proteinazom K mora se postaviti na položaje 1 i 2 u utoru A ladice „Sample“ (Uzorak). Preporučujemo da za proteinazu K upotrebljavate polistirenske epruvete sa zaobljenim dnom od 14 ml veličine 17 x 100 mm (Corning, kat. br. 352051).

- Ako su uzorci označeni crtičnim kodovima, uzorke u nosaču epruveta okrenite tako da crtični kodovi budu okrenuti prema čitaču crtičnih kodova na lijevoj strani instrumenta QIASymphony SP.
- Informacije o epruvetama za uzorke i minimalnim volumenima uzoraka kompatibilnima s protokolima potražite na odgovarajućem popisu laboratorijske opreme koji možete pronaći na karticama Product Resource (Resursi za proizvod) i karticama Resources (Resursi) na stranicama proizvoda na web-mjestu **www.qiagen.com** odnosno **www.PreAnalytiX.com**.

Protokol: automatizirano pročišćavanje ccfDNA na instrumentu QIASymphony SP

Detaljne informacije o svakom protokolu, uključujući volumene i epruvete, navedene su na listu protokola i na popisu laboratorijske oprema koje možete pronaći na karticama Product Resource (Resursi za proizvod) i karticama Resources (Resursi) na stranicama proizvoda na web-mjestu **www.qiagen.com** odnosno **www.PreAnalytiX.com**. Za pripremu materijala uzorka (plazma dobivena iz humane venske pune krvi prikupljene u epruvetu PAXgene Blood ccfDNA Tube), pogledajte odjeljke „Prikupljanje i priprema ispitaka“ i „Priprema materijala uzorka“ u ovom priručniku kao i upute za uporabu epruveta koje možete pronaći na kartici **Product Resources** (Resursi za proizvod) i kartici Resources (Resursi) na stranici proizvoda na web-mjestu **www.qiagen.com** odnosno **www.PreAnalytiX.com**.

1. Zatvorite sve ladice i poklopac.
2. Uključite instrument QIASymphony SP i pričekajte da se pojavi zaslon Sample Preparation (Priprema uzorka) te da završi postupak inicijalizacije.
3. Sklopka za napajanje nalazi se u donjem lijevom kutu instrumenta QIASymphony SP.
4. Prijavite se na instrument.

Postavite potrebni nosač za eluciju u ladicu „Eluate“ (Eluat).

Ne postavljajte pločicu s 96 jažica u „Elution slot 4“ (Otvor za eluciju 4). Morate upotrijebiti „Elution slot 1“ (Otvor za eluciju 1) s odgovarajućim adapterom za hlađenje.

Kada upotrebljavate pločicu s 96 jažica, pobrinite se da je pločica pravilno usmjerena jer nepravilno postavljanje može dovesti do miješanja uzoraka u daljnjoj analizi.

Kada upotrebljavate nosač Elution Microtubes CL, skinite dno zakretanjem nosača sve dok se dno ne odvoji.

5. Pobrinite se da je ladica „Waste“ (Otpad) pravilno pripremljena i obavite skeniranje sadržaja ladice „Waste“ (Otpad), uključujući ispušt vršaka, mjesto za odlaganje vršaka, prazni spremnik za tekući otpad i prazne kutije jedinica. Po potrebi zamijenite vrećicu za odlaganje vršaka.
6. Napunite potrebne RC-ove i potrošne materijale u ladicu „Reagents and Consumables“ (Reagensi i potrošni materijali).
7. Obavite skeniranje sadržaja ladice „Reagents and Consumables“ (Reagensi i potrošni materijali).
8. Postavite uzorke u odgovarajući nosač uzoraka i napunite ih u ladicu „Sample“ (Uzorak).

Napomena: uz redovnu obradu koja obuhvaća prijenos plazme u odgovarajuću sekundarnu epruvetu (polistirenska epruveta Falcon® sa zaobljenim dnom od 14 ml veličine 17 mm x 100 mm) postavljenu u odgovarajući nosač uzoraka, tijekom rada rukovanja primarnom epruvetom PAXgene Blood ccfDNA Tube omogućava ekstrakciju ccfDNA izravno iz epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube (epruveta PAXgene Blood ccfDNA Tube od 10 ml, veličine 16 mm x 100 mm). Dodatne informacije o rukovanju primarnom epruvetom potražite na listu protokola, na popisu laboratorijske opreme i u uputama za uporabu epruveta koje možete pronaći na kartici Product Resources (Resursi za proizvod) i kartici Resources (Resursi) na stranici proizvoda na web-mjestu **www.qiagen.com** odnosno **www.PreAnalytiX.com**.

9. Koristeći se zaslonom osjetljivim na dodir unesite potrebne informacije za svaku seriju uzoraka i za proteinazu K koje treba obraditi.

Unesite sljedeće informacije:

- informacije o uzorku (ovisno o nosačima za uzorke koje upotrebljavate, odaberite BD #352051 FalconPP 17 x 100 ili BD_#768165 PAXgene ccfDNA 16 x 100)
- protokol koji treba provesti (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 čekanja, prikazuje se gumb Run (Pokreni).

10. Postavite proteinazu K u odgovarajući nosač uzoraka na položaju 1 i 2 i umetnite ih u utor A ladice „Sample“ (Uzorak).
11. Definirajte proteinazu K tako da pritisnete gumb **IC** (Interna kontrola).
12. Pritisnite gumb Run (Pokreni) kako biste pokrenuli postupak pročišćavanja. Svi koraci obrade u potpunosti su automatizirani. Na kraju postupka protokola status serije mijenja se iz RUNNING (U tijeku) u COMPLETED (Završeno).
13. Dohvatite nosač za eluciju u kojem se nalazi pročišćena ccfDNA iz ladice „Eluate“ (Eluat). Potvrdite vađenje nosača za eluciju s pomoću softvera instrumenta QIASymphony SP.
14. ccfDNA je spremna za uporabu ili se može čuvati na -20°C ili -80°C do 6 mjeseci. Društvo QIAGEN preporučuje vađenje pločice za eluat iz ladice „Eluate“ (Eluat) odmah nakon završetka postupka. Ovisno o temperaturi i vlažnosti, ostavljanje pločica za eluciju u instrumentu QIASymphony SP nakon završetka postupka za posljedicu može imati kondenzaciju ili isparavanje.

Napomena: funkcija hlađenja instrumenta QIASymphony SP omogućava postupke na instrumentu preko noći.

Magnetske čestice načelno se ne prenose u eluate. Ako do prijenosa ipak dođe, magnetske čestice u eluatima neće utjecati na većinu postupaka daljnje obrade.

Ako magnetske čestice treba ukloniti prije postupaka daljnje obrade, epruvete ili pločice s eluatima najprije treba postaviti u odgovarajući magnet, a eluate treba prenijeti u čistu epruvetu (pogledajte „Dodatak: kvantifikacija ccfDNA“). Za svaku pločicu za eluciju stvaraju se datoteke s rezultatima.

15. Ako je RC samo djelomično iskorišten, zatvorite ga priloženim trakama za zatvaranje radi ponovne uporabe nakon postupka protokola kako biste izbjegli isparavanje.

Napomena: za dodatne informacije o pohrani djelomično iskorištenih RC-ova pogledajte „Pohrana i rukovanje reagensima“.

16. Bacite iskorištene epruvete za uzorke i otpad u skladu s lokalnim sigurnosnim propisima. Sigurnosne informacije potražite u odjeljku „Upozorenja i mjere opreza“.
17. Očistite instrument QIASymphony SP.
Slijedite upute za održavanje iz korisničkih priručnika priloženih uz instrument. Obavezno redovito čistite štitnike vršaka kako biste rizik od križne kontaminacije sveli na najmanju moguću mjeru.
18. Zatvorite ladice instrumenta i isključite instrument 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 ispituje se prema unaprijed određenim specifikacijama kako bi se osigurala dosljedna kvaliteta proizvoda.

Ograničenja

Radne značajke sustava određene su u studijama procjene radnih značajki u kojima se pročišćavala ccfDNA iz plazme dobivene iz humane venske pune krvi prikupljene u epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube.

Radne značajke kompleta QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit utvrđene su s pomoću fragmenata ccfDNA koji sadržavaju ribosomski 18S i fragmenata ccfDNA na sekvenci DYS14 na Y kromosomu u plazmi.

Odgovornost je korisnika potvrditi radne značajke sustava za sve postupke koji se izvode u laboratoriju, a koje ne pokrivaju studije procjene radnih značajki društva QIAGEN i PreAnalytiX.

Kako bi se rizik od negativnog utjecaja na dijagnostičke rezultate sveo na najmanju moguću mjeru, u postupcima daljnje obrade treba 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 do kojih može doći. Za podatke za kontakt i popis često postavljanih pitanja posjetite odgovarajuću stranicu proizvoda na web-mjestu www.PreAnalytiX.com ili www.qiagen.com.

Komentari i prijedlozi	
Općenito rukovanje	
a) Poruke o pogreškama koje se prikazuju na zaslonu osjetljivom na dodir	Ako se za vrijeme protokola prikaže poruka o pogrešci, pogledajte korisničke priručnike isporučene s instrumentom.
b) Promjenjivi volumen eluata nakon postupaka preko noći	Kako bi se optimizirao protok, QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit podržava obradu uzoraka preko noći hlađenjem eluata na instrumentu QIASymphony SP. Tijekom dugih razdoblja hlađenja volumeni eluata mogu se mijenjati ovisno o temperaturi i vlažnosti u laboratoriju. Primjerice, ako je odabrani volumen bio 60 µl pri temperaturi od 15 °C – 25 °C i vlažnosti od 30 % – 60 %, raspon volumena može biti 50 µl – 85 µl nakon 12 sati pohrane na instrumentu.
Krioprecipitati nakon odmrzavanja uzoraka plazme	
a) U plazmi se formiraju krioprecipitati	Da bi se spriječilo formiranje krioprecipitata, plazma se umjesto na sobnoj temperaturi može odmrzavati na 30 °C u trajanju od 30 min. Ne odmrzavajte na nižim temperaturama (npr. 4 °C). Nakon odmrzavanja miješajte epruvetu na vrtložnoj miješalici 30 sekundi.
b) Niski prinos ccfDNA iz plazme nakon uklanjanja krioprecipitata	Ne centrifugirajte plazmu da biste uklonili krioprecipitate jer oni mogu sadržavati ccfDNA.
Nedovoljan volumen plazme iz epruveta PAXgene Blood ccfDNA Tube	
a) U epruvetu PAXgene Blood ccfDNA Tube prikupljeno je manje od 10 ml krvi	Pobrinite se da je u epruvetu PAXgene Blood ccfDNA Tube prikupljeno 10 ml krvi. Pogledajte upute za uporabu epruvete PAXgene Blood ccfDNA Tube.
b) Visoka frakcija stanica	Visoka razina frakcije stanica (hematokrit) u humanoj punoj krvi (npr. iznad 51 % za muškarca ili 47 % za ženu) može dovesti do smanjenih volumena plazme.
c) Slab prinos plazme nakon centrifugiranja	Dulja vremena pohrane krvi i transporta ili drugačiji uvjeti centrifugiranja u odnosu na navedene mogu utjecati na prinose plazme.

Komentari i prijedlozi	
Precipitat u spremniku otvorenog uloška reagensa (Reagent Cartridge, RC) u kompletu QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit	
a) Isparavanje pufera	Prekomjerno isparavanje može dovesti do povećane koncentracije soli u puferima. Bacite RC. Obavezno zatvorite spremnike pufera djelomično iskorištenih RC-ova trakama za zatvaranje radi ponovne uporabe kada ih ne upotrebljavate za pročišćavanje.
b) Pohrana RC-ova	Pohrana RC-ova na temperaturi nižoj od 15 °C može dovesti do formiranja precipitata.
Slab prinos ccfDNA	
a) Magnetske čestice nisu potpuno resuspendirane	Prije nego što započnete postupak, provjerite jesu li magnetske čestice potpuno resuspendirane. Prije uporabe miješajte na vrtložnoj miješalici najmanje 3 minute. Nepotpuno resuspendiranje može dovesti do pogrešaka pipetiranja.
b) Začepljenje vrška pipete netopivim materijalom	Netopljivi materijal nije uklonjen iz uzorka prije započinjanja postupka pročišćavanja na instrumentu QIASymphony SP.
c) Materijal uzorka sadržava nisku koncentraciju ccfDNA	Zbog vrlo malih količina ccfDNA u uzorcima plazme mjerenje koncentracije ccfDNA može predstavljati izazov ovisno o metodi kvantifikacije koja se upotrebljava. Preporučuje se uporaba osjetljivog qPCR-a radi provjere koncentracije ccfDNA u eluatima.
d) Nepotpuno ponovno zatvaranje RC-a	Miješanje s okolnim zrakom može dovesti do smanjene stabilnosti pufera, što uzrokuje smanjenu učinkovitost ekstrakcije ccfDNA s djelomično iskorištenim RC-om. Obavezno pažljivo zatvorite spremnike pufera djelomično iskorištenog RC-a trakama za zatvaranje radi ponovne uporabe kada ih ne upotrebljavate za pročišćavanje.
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 uslijed visokih temperatura i koncentriranih soli u eluatu, što može ometati postupke daljnje obrade.
b) Prijenos kuglica	Magnetske čestice načelno se ne prenose u eluate. Ako do prijenosa ipak dođe, magnetske čestice u eluatima neće utjecati na većinu postupaka daljnje obrade. Ako su za određena daljnja ispitivanja potrebni vrlo veliki udjeli eluata, eluate možete vrtnjom pogurnuti prema dolje i prenijeti ih u čistu epruvetu.
Nema prijenosa uzorka ili je prijenos nepotpun	
a) Neodgovarajući volumen uzorka postavljen je za standardne protokole	Ako postavite volumen uzorka koji je manji od navedenog, postoji povećani rizik od označavanja uzorka kao nejasnog ili od izostanka prijenosa uzorka (označavanje uzorka kao nevažnog). Postavite odgovarajući volumen uzorka, kako je opisano u odgovarajućem listu protokola i na popisu laboratorijske opreme.
b) Mjehurići i/ili pjena u epruveti za uzorke	Mjehurići ili pjena u uzorku i/ili epruveti za unos uzorka mogu rezultirati netočnom detekcijom razine tekućine i naknadnim nepotpunim prijenosom uzorka. Uklonite mjehuriće iz epruvete za uzorke.

Simboli

U uputama za uporabu ili na ambalaži i naljepnicama mogu se nalaziti sljedeći simboli. Dodatni simboli pojašnjeni su pod Sadržaj kompleta (stranica 9).

Simbol	Definicija simbola
	Sadržava reagensa dovoljno za <N> testova Označava ukupni broj IVD testova koji se mogu izvesti in vitro dijagnostičkim medicinskim proizvodom.
	Upotrijebiti do
	In vitro dijagnostički medicinski proizvod
	Oznaka CE. Proizvod ispunjava zahtjeve Europske uredbe 2017/746 za in vitro dijagnostičke medicinske proizvode.
	Kataloški broj
	Broj serije
	Broj materijala (tj. oznaka komponente)
	Komponente (tj. popis svega što je isporučeno)
	Sadržava (sadržaj)
	Broj (tj. bočice, boce)
	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



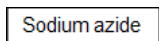
Proteinaza K



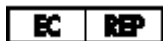
Broj jažice (tj. jažica za RC)



Uložak reagensa



Natrijev azid



Ovlašteni zastupnik za Europu u skladu s Uredbom (EU) 2017/746

Dodatak: kvantifikacija ccfDNA

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

Ako treba ukloniti magnetske čestice, držite epruvetu koja sadržava DNK na odgovarajućem magnetskom separatoru (npr. QIAGEN 12-Tube Magnet, kat. br. 36912) sve dok se magnetske čestice ne odvoje.

Ako se DNK nalazi u mikropločicama, držite mikropločicu na odgovarajućem magnetskom separatoru (npr. QIAGEN 96-Well Magnet Type A, kat. br. 36915) sve dok se magnetske čestice ne odvoje. Ako odgovarajući magnetski separator nije dostupan, punom brzinom u mikrocentrifugi centrifugirajte epruvetu s DNK u trajanju od 1 minute kako biste istaložili sve preostale magnetske čestice.

Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
PreAnalytiX		
QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) (192)	Uključuje 2 RC-a, epruvete s proteinazom K i pribor	768566
PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD)(100)	100 epruveta: 16 mm × 100 mm, aditiv od 1,5 ml, količina izvađene krvi 10 ml	768165
QIAGEN		
QIASymphony SP instrument	Modul za pripremu uzoraka QIASymphony, jamstvo od 1 godine na dijelove i rad	9001297
Povezani proizvodi društva QIAGEN		
Proteinase K (10 mL)	Bočica 1 × 10 ml	19134
Reagent Cartridge Holder (2)	Držać RC-a za uporabu s instrumentom QIASymphony SP	997008
Cooling Adapter, 2 mL, v2, Qsym	Adapter za hlađenje za epruvete od 2 ml s navojnim čepom. Za uporabu u ladići „Eluate“ (Eluat) instrumenta QIASymphony SP	9020674
Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym	Adapter za hlađenje za nosače EMT. Za uporabu u ladići „Eluate“ (Eluat) instrumenta 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 ladići „Eluate“ (Eluat) instrumenta QIASymphony SP	9020731
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Ulošci za pripremu uzoraka s 8 jažica za uporabu s instrumentom QIASymphony SP	997002

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
8-Rod Covers (144)	Pokrovi za 8 štapića za uporabu s instrumentom QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µL (1024)	Jednokratni vršci s filtrom, na nosaču; (8 × 128). Za uporabu s instrumentima QIAcube® i QIASymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µL, Qsym SP (1024)	Jednokratni vršci s filtrom, na nosaču; (8 × 128). Za uporabu s instrumentom QIASymphony SP/AS	997024
Tip Disposal Bags (15)	Vrećica za odlaganje vršaka za uporabu s instrumentom QIASymphony SP	9013395
12-Tube Magnet	Magnet za odvajanje magnetskih čestica u 12 × epruveta od 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 × mikropločica FB s 96 jažica	36915
Reuse Seal Set (20)	Kompleti za zatvaranje radi ponovne uporabe za zatvaranje djelomično iskorištenih RC-ova QIASymphony	997006
Elution Microtubes CL (24 × 96)	Nesterilne polipropilenske epruvete (maksimalni kapacitet 0,85 ml, manje od 0,7 ml kapaciteta pohrane, kapacitet elucije od 0,4 ml); 2304 na nosačima od 96, uključuje trake za čepove	19588
Caps for Elution Microtubes (50 × 8)	Čepovi za Elution Microtubes (50 × 8)	19591
14 mL Falcon Tube	Polistirenska epruveta sa zaobljenim dnom veličine 17 mm × 100 mm koja se upotrebljava kao nosač uzoraka za instrument QIASymphony SP	Corning, 352051

Povijest revizija dokumenta

Revizija	Opis
R1, svibanj 2021.	Prvo izdanje
R2, svibanj 2022.	Na nekim mjestima uklonjeno „(CE-IVD)“. Ažurirana tablica Sadržaj kompleta. Uključena poveznica www.PreAnalytiX.com kao mjesto na kojem se mogu pronaći povezani resursi. U odjeljku „Sigurnosne informacije“ „ispitci“ pobliže određeni kao „ispitci krvi“. U odjeljku „Sigurnosne informacije“ tekst „Odlazite otpad od uzoraka i ispitivanja“ promijenjen u „Biološki opasne materijale i otpad kompleta odložite“. Ažurirani odjeljci „A) Priprema plazme iz krvi za standardne protokole“ i „B) Priprema plazme iz krvi za rukovanje primarnom epruvetom na instrumentu QIASymphony SP“.
R3, veljača 2023.	Ulica u adresi društva PreAnalytiX GmbH promijenjena iz „Feldbachstrasse“ u „Garstligweg 8“. Ažuriranje odjeljka Mjere opreza. Dodavanje informacija za slučaj nužde u odjeljku Sigurnosne informacije. Ispravljanje kataloškog broja za proteinazu K (100 ml) u odjeljku Informacije za naručivanje. Izmjene rasporeda i uređivanja.

Napomene

Napomene



Ažurirane informacije o licenciranju i izjave o odricanju od odgovornosti specifične za proizvod pogledajte u odgovarajućem priručniku za komplet tvrtke PreAnalytiX® ili QIAGEN® ili korisničkom priručniku. Priručnici i korisnički priručnici za komplete PreAnalytiX i QIAGEN dostupni su na www.qiagen.com ili ih možete zatražiti od tehničke službe društva QIAGEN ili svojeg lokalnog distributera.

Saznajte više na web-mjestu: www.PreAnalytiX.com

HB-2866-003 02/2023



A QIAGEN / BD Company