

INSTRUKCJA TECHNICZNA

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit

Instrukcja użytkowania produktu
AS1580

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

Uwaga: Aby użyć zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit, należy załadować metodę Maxwell® CSC Rapid ccfDNA do urządzenia Maxwell® CSC lub Maxwell® CSC 48.



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanower, Niemcy



INSTRUKCJA
UŻYTKOWANIA
PRODUKTU

AS1580



Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit

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

1. Opis	2
2. Elementy produktu, warunki przechowywania i objaśnienie symboli	3
3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu.....	5
4. Ograniczenia stosowania produktu	5
5. Przygotowanie próbek osocza	5
6. Przygotowanie kartridży Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges	6
7. Konfiguracja i uruchamianie urządzenia Maxwell® Instrument.....	9
8. Czynności po zakończeniu oczyszczania	11
9. Ocena wydajności analitycznej.....	11
9.A. Ilość i jakość ccfDNA.....	11
9.B. Amplifikacja i inhibicja (substancje zakłócające)	13
9.C. Ilościowe oznaczanie ccfDNA za pomocą barwnika fluorescencyjnego i qPCR	13
9.D. Odtwarzalność.....	14
9.E. Zanieczyszczenie krzyżowe	14
9.F. Kompatybilność z sekwencjonowaniem nowej generacji	14
9.G. Kompatybilność z cyfrowym PCR	15
10. Ocena wydajności klinicznej	15
11. Uwagi dotyczące pracy z ccfDNA	15
11.A. Przygotowanie osocza	15
11.B. Zalecenia dotyczące ilościowego oznaczania ccfDNA	16
12. Rozwiązywanie problemów	17
13. Powiązane produkty	18

Zestaw Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit jest dostępny tylko w niektórych krajach.

1. Opis

Zestaw Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit jest przeznaczony do stosowania z aparatami Maxwell® wymienionymi w Tabeli 1, aby zapewnić prostą metodę wydajnej, zautomatyzowanej ekstrakcji i oczyszczania krążącego wolnego od komórek DNA (ccfDNA) z 1–4 ml próbek osocza ludzkiego. Aparaty Maxwell® CSC Instruments są przeznaczone do stosowania ze wstępnie rozdzielonymi kartridżami z odczynnikami i wstępnie zaprogramowanymi metodami ekstrakcji, co maksymalizuje prostotę i wygodę. Za pomocą metody Maxwell® CSC Rapid ccfDNA można przetworzyć próbki od jednej do maksymalnej liczby próbek obsługiwanej przez aparaty Maxwell® CSC Instruments w czasie krótszym niż 30 minut. Wyekstrahowany ccfDNA może być użyty bezpośrednio w różnych aplikacjach, takich jak cyfrowa analiza PCR i sekwencjonowanie nowej generacji (NGS).

Tabela 1. Kompatybilność z urządzeniami.

Urządzenie	Nr kat.	Instrukcja techniczna	Maksymalna liczba próbek
Maxwell® CSC	AS6000	TM457	16
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623	48

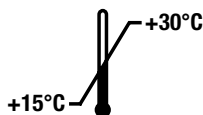
Zasada metody

Zestaw Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit oczyszcza ccfDNA z próbek osocza za pomocą cząstek paramagnetycznych, które zapewniają ruchomą fazę stałą, która optymalizuje wychwytywanie, płukanie i oczyszczanie próbek ccfDNA. Aparaty Maxwell® Instruments to narzędzia do obsługi cząstek magnetycznych, które skutecznie wiążą ccfDNA z cząstkami paramagnetycznymi w pierwszych trzech studzienkach wstępnie napełnionego kartridża. Próbki są przetwarzane w ramach cykli płukania, zanim ccfDNA zostanie eluowany. Zastosowanie magnetycznego wychwytywania pozwala na uniknięcie często występujących problemów, takich jak zatkane końcówki lub częściowe przeniesienie odczynnika, które obniżają jakość procesów oczyszczania w innych powszechnie stosowanych zautomatyzowanych systemach.

2. Elementy produktu, warunki przechowywania i objaśnienie symboli

PRODUKT	ILOŚĆ	NR KAT.
Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit	48 preparatów	AS1580

Do stosowania w diagnostyce in vitro. Wyłącznie do użytku przez specjalistów. Zawiera wystarczającą ilość odczynników do 48 automatycznych izolacji ccfDNA z próbek osocza. Kartridże są przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku.



Zawartość zestawu:

- 48 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (CSCS)
- 50 CSC/RSC Plungers
- 50 Elution Tubes (0,5 ml)
- 20 ml Elution Buffer (RCFD)
- 1 ml roztworu proteinazy K (PK2)

Warunki przechowywania: Przechowywać zestaw Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit w temperaturze +15°C do +30°C.



Informacje dotyczące bezpieczeństwa: Więcej informacji na temat bezpieczeństwa znajduje się w karcie charakterystyki produktu (Safety Data Sheet, SDS). Należy przestrzegać obowiązujących w instytucji wytycznych dotyczących postępowania ze wszystkimi odpadami chemicznymi używanymi z tym systemem oraz utylizacji takich odpadów.



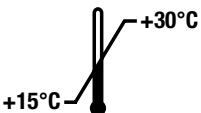
Kartridże Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (CSCS) są przeznaczone do stosowania z czynnikami potencjalnie zakaźnymi. Podczas pracy z czynnikami zakaźnymi należy nosić odpowiednie środki ochrony (np. rękawiczki i okulary ochronne). Należy przestrzegać obowiązujących w instytucji wytycznych dotyczących postępowania ze wszystkimi czynnikami zakaźnymi używanymi z tym systemem oraz utylizacji takich czynników.



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

Informacje dodatkowe: Elementy zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit zostały dopuszczone do łącznego stosowania na podstawie odpowiednich procedur kwalifikacyjnych i testów kontroli jakości. Nie mieszać elementów zestawu z elementami zestawów różnych serii. Należy używać wyłącznie elementów dostarczonych w zestawie. Dodatkowe informacje dotyczące bezpieczeństwa znajdują się w karcie charakterystyki dostępnej na stronie: www.promega.com

Objaśnienie symboli

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

3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu

Zestaw Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit jest przeznaczony do stosowania, w połączeniu z narzędziami Maxwell® CSC Instruments i metodą Maxwell® CSC Rapid ccfDNA, jako wyrób medyczny do diagnostyki in vitro (IVD) do automatycznej izolacji krążącego DNA wolnego od komórek (ccfDNA) z próbek osocza ludzkiego. Oczyszczony ccfDNA nadaje się do stosowania w testach diagnostycznych in vitro opartych na amplifikacji, w tym cyfrowej analizie PCR.

Zestaw Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit jest przeznaczony do stosowania w temperaturze od 15°C do 30°C. Stosowanie poza tym zakresem temperatur może skutkować nieoptymalnymi wynikami.

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

4. Ograniczenia stosowania produktu

Wydajność zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit została oceniona na próbkach ludzkiego osocza przygotowanych z krwi pełnej pobranej w Streck Cell-Free DNA BCT i probówkach do pobierania krwi z antykoagulantem K₂EDTA. Użytkownik jest odpowiedzialny za zatwierdzenie użycia zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit do oczyszczania ccfDNA z osocza pobranego w innych probówkach do pobierania krwi.

Przydatność kwasu nukleinowego oczyszczonego przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit do stosowania w sekwencjonowaniu następnej generacji (NGS) została wykazana podczas opracowywania produktu, ale nie została zweryfikowana.

We wszystkich aplikacjach diagnostycznych, w których zastosowano ccfDNA oczyszczony za pomocą zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit, muszą być dołączone odpowiednie kontrole. Użytkownik odpowiada za ustalenie charakterystyki roboczej wymaganej w dalszych zastosowaniach diagnostycznych.

5. Przygotowanie próbek osocza

Materiały zapewniane przez użytkownika

- Krew pełna lub osocze
- Wirówka stołowa

W przypadku krwi pełnej pobranej do probówek z EDTA, krew powinna być przetworzona natychmiast po pobraniu lub przechowywana w temperaturze od +2°C do +10°C do czasu przygotowania osocza. Wirować krew pełną z probówek EDTA przez ≥10 minut z prędkością ≥2 000 × g w celu usunięcia czerwonych i białych krwinek. W przypadku urządzeń Streck Cell-Free DNA BCT® należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta. Po pierwszym odwirowaniu probówek Streck Cell-Free DNA BCT® lub probówek do pobierania krwi EDTA, użyć pipety, aby ostrożnie usunąć jak najwięcej osocza bez naruszania kożuszka i przenieść do nowej probówki. Aby upewnić się, że nie doszło do przeniesienia białych krwinek, odwirować osocze po raz drugi przez ≥10 minut z prędkością ≥2 000 × g i przenieść supernatant do czystej probówki.

Przechowywać osocze w temperaturze od +2°C do +10°C maksymalnie przez tydzień. W przypadku dłuższego okresu przechowywania, osocze należy przechowywać w temperaturze od -30°C do -10°C (lub poniżej -65°C). Unikać narażania osocza na cykle zamrażania i rozmrażania. Rozdział 11.A zawiera informacje dotyczące stosowania mrożonego osocza.

6. Przygotowanie kartridży Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges

1. Przed rozpoczęciem pracy z kartridżami Maxwell® CSC, tłoczkami CSC/RSC Plungers i probówkami Elution Tubes (0,5 ml) należy zmienić rękawiczki. Umieścić kartridże na stojaku Maxwell® CSC/RSC tak, aby dołek nr 1 (największy dołek w kartridżu) był skierowany w przeciwną stronę do probówek do elucji. Nacisnąć kartridż, aby zatrzasknął się w odpowiednim położeniu. Ostrożnie zdjąć zamknięcie tak, aby usunąć całe zamknięcie z górnej części kartridża. Przed umieszczeniem kartridży w urządzeniu upewnić się, że cała taśma uszczelniająca i pozostałości kleju zostały usunięte.



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

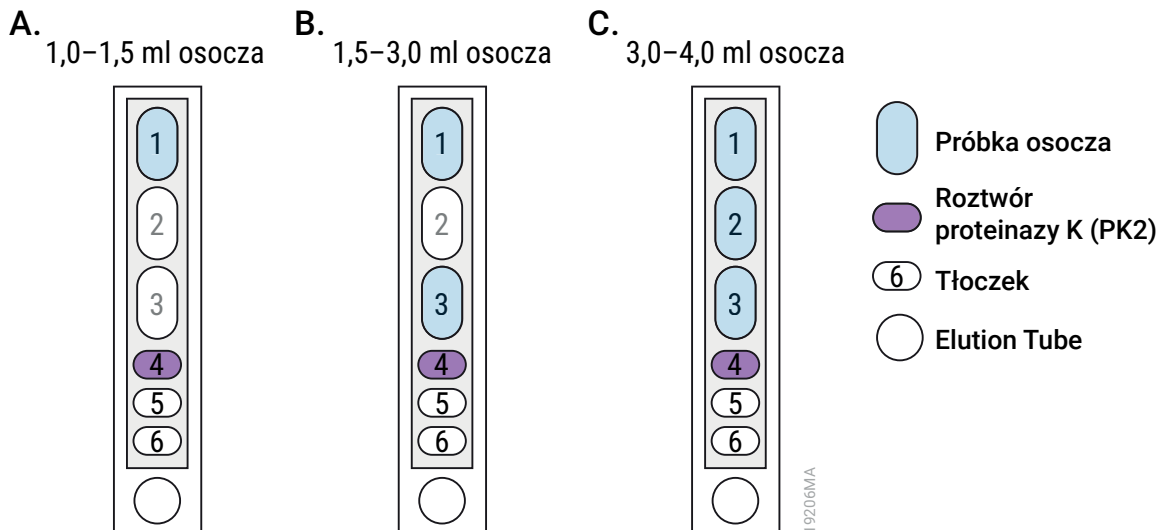
2. W zależności od całkowitej objętości próbki osocza, przenieść osocze tylko do studzienki #1 (pierwsza największa studzienka), tylko do studzienek #1 i #3 (pierwsza i trzecia największa studzienka) lub do studzienek #1, #2 i #3 (trzy największe studzienki) kartridżu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA, jak wskazano w Tabeli 2. Zmieniać końcówki pipet między różnymi próbkami osocza, aby uniknąć zakażenia krzyżowego.

Tabela 2. Przenoszenie próbki osocza do różnych studzienek kasety Maxwell® CSC Cartridge w zależności od objętości wejściowej próbki.

Objętość próbki (ml)	Instrukcje przeniesienia próbki
1,0 ml do 1,5 ml osocza	Dodać osocze tylko do studzienki #1. Patrz Rysunek 1, Panel A.
>1,5 ml do ≤3,0 ml osocza	Dodać równe objętości osocza do studzienek #1 i #3. Patrz Rysunek 1, Panel B.
3,0 ml do 4,0 ml osocza	Dodać równe objętości osocza do studzienek #1, #2 i #3. Patrz Rysunek 1, Panel C.

Uwagi:

- **Nie dozować więcej niż 1,5 ml osocza na studzienkę.**
- **Przy objętościach wejściowych osocza 1,0–1,5 ml, całą próbkę osocza należy dodać tylko do studzienki #1.** Dodanie osocza do studzienki #2 lub #3 negatywnie wpłynie na odzysk ccfDNA.
- **Przy objętościach wejściowych osocza wynoszących 1,5–3,0 ml, osocze można dodawać tylko do studzienek #1 i #3.** Dodanie osocza w dowolnej innej konfiguracji dołków (np. w studzienkach #2 i #3 lub w studzienkach #1 i #2) będzie miało negatywny wpływ na odzysk ccfDNA.



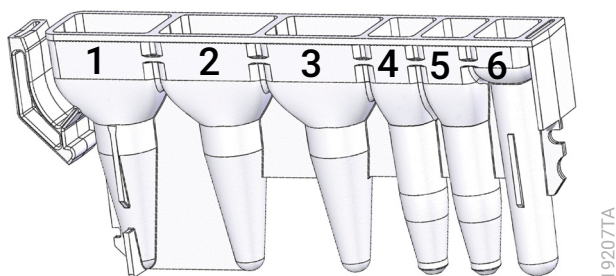
Rysunek 1. Przenoszenie próbki osocza do różnych studzienek kartridża Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge zależy od objętości wejściowej próbki. W przypadku próbek osocza o objętości 1,0–1,5 ml przenieść całą próbkę do studzienki #1 (**Panel A**). W przypadku próbek osocza o objętości 1,5–3,0 ml należy przenieść równe objętości osocza do studzienek #1 i #3 (**Panel B**). W przypadku próbek osocza 3,0–4,0 ml przenieść równe objętości osocza do studzienek #1, #2 i #3 (**Panel C**). Odmierzyć 10 µl roztworu proteiny K (PK2) do studzienki #4. Dodać 50 µl buforu Elution Buffer (RCFD) do próbowki Elution Tube (oznaczonej kółkiem u dołu każdego z paneli). Umieścić tłoczek w studzience #6.

3. Odmierzyć 10 µl roztworu proteiny K (PK2) do studzienki #4.
4. Umieścić jeden tłoczek w studzience #6 każdego kartridża.
5. Umieścić pustą próbówkę Elution Tube w położeniu próbowki do elucji dla każdego kartridża na tacach blatowych. Dodać 50 µl buforu Elution Buffer (RCFD) na dno każdej próbowki Elution Tube.
6. Przejsz do rozdziału 7 – Konfiguracja i uruchamianie urządzenia Maxwell® Instrument.

Uwagi:

- a. Wycieki próbki lub odczynnika na dowolną część stojaka na kartridże należy usuwać za pomocą roztworu detergentu i wody. Następnie należy spryskać powierzchnię sprayem bakteriobójczym lub wytrzeć ściereczką i przemyć ją wodą. Nie stosować wybielacza do czyszczenia żadnych elementów urządzenia Maxwell® Instrument.
- b. Używać wyłącznie próbówek Elution Tubes 0,5 ml dołączonych do zestawu; inne próbówki mogą być niezgodne z urządzeniem Maxwell® Instrument.
- c. Dostarczony bufor Elution Buffer (RCFD) jest niezbędny do skutecznego odzyskiwania ccfDNA. Nie zastępować buforu Elution Buffer (RCFD) alternatywnymi buforami do elucji. Użycie alternatywnych buforów elucyjnych negatywnie wpłynie na odzysk ccfDNA.
- d. Wyższe stężenia ccfDNA można osiągnąć przy użyciu mniej niż 50 µl buforu Elution Buffer (RCFD), ale całkowita wydajność może być zmniejszona.

6. Przygotowanie kartridży Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (ciąg dalszy)



Użytkownik dodaje do dołeków:

1. Próbkę osocza (szczegóły w Tabeli 2 i na Rysunku 1)
lub
- 1.,3. Próbkę osocza
lub
- 1.,2.,3. Próbkę osocza
4. Roztwór proteiny K (PK2)
6. CSC/RSC Plunger

Rysunek 2. Kartridż Maxwell® CSC Cartridge. Próbkę osocza została dodana do studzienki #1 (1,0–1,5 ml próbki), studzienek #1 i #3 (1,5–3,0 ml próbki) lub studzienek #1, #2 i #3 (3,0–4,0 ml próbki), w zależności od objętości próbki. Do studzienki #4 dodano 10 µl roztworu proteiny K (PK2), a do studzienki #6 dodano tłoczek.



Rysunek 3. Ustawianie i konfiguracja stojaków na kartridże. Bufor Elution Buffer (RCFD) jest dodawany do próbek do elucji we wskazany sposób. Tłoczki znajdują się w położeniu #6 kartridża. Przedstawiony stojak na kartridże pochodzi z urządzenia Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000).

7. Konfiguracja i uruchamianie urządzenia Maxwell® Instrument

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

1. Włączyć urządzenie Maxwell® Instrument i Tablet PC. Zalogować się na komputerze typu Tablet PC i uruchomić oprogramowanie Maxwell® CSC IVD-mode, dotykając dwukrotnie ikony na pulpicie. Aparat przeprowadzi autotest i ustawi w położeniu wyjściowym wszystkie ruchome części.
2. Wybrać opcję **Rozpocznij** na ekranie głównym.
3. Zeskanować lub wprowadzić kod kreskowy w prawym górnym rogu etykiety zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit i wybrać opcję **OK** aby automatycznie wybrać metodę do uruchomienia (Rysunek 4).

Uwaga: Do oczyszczania ccfDNA w aparacie Maxwell® CSC Instruments wymagany jest kod kreskowy metody z kodem kreskowym zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit. Etykieta zestawu zawiera dwa kody kreskowe. Kod kreskowy metody przedstawiono na Rysunku 4. Jeżeli nie można zeskanować kodu kreskowego, należy skontaktować się z działem Promega Technical Services.



Rysunek 4. Etykieta zestawu z kodem kreskowym do zeskanowania. Kod kreskowy do zeskanowania, służący do uruchomienia cyklu oczyszczania, znajduje się w niebieskiej ramce, w prawym górnym rogu etykiety zestawu.

4. Na ekranie „Konfiguracja kasety” sprawdzić, czy metoda Maxwell® CSC Rapid ccfDNA jest wyświetlana na górze ekranu. Dotknąć pozycji kartridża, aby zaznaczyć lub odznaczyć wszelkie położenia, które mają zostać użyte w ramach przebiegu ekstrakcji. Wprowadzić wymagane dane identyfikacyjne próbek i nacisnąć przycisk **Kontynuuj**, aby kontynuować.

Uwaga: W aparacie Maxwell® CSC 48 Instrument wybrać lub usunąć zaznaczenie pozycji kaset na każdej tacy platformy za pomocą przycisków **Przód** i **Wstecz**.

7. Konfiguracja i uruchamianie urządzenia Maxwell® Instrument (ciąg dalszy)

5. Po otwarciu drzwi potwierdzić, czy wykonano wszystkie czynności z listy kontrolnej ekstrakcji. Sprawdzić, czy próbki osocza zostały dodane do odpowiednich studzienek kartridży, roztwór proteinazy K (PK2) został dodany do studzienki #4 kartridża, tłoki są w studzience #6, kartridże są załadowane w aparacie i czy obecne są otwarte próbówki z buforem Elution Buffer (RCFD). Przenieść stojaki na kartridże zawierające przygotowane kartridże do platformy urządzenia Maxwell® Instrument.

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

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

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



Ostrzeżenie: Niebezpieczeństwo zmiżdżenia.

Uwaga: W przypadku korzystania z urządzenia Maxwell® Instrument z 48 pozycjami i włączenia systemu wizualizacji skanowanie stojaków na kartridże rozpocznie się po wsunięciu platformy. Wszelkie błędy w konfiguracji stojaków na kartridże (np. tłoczki nieznajdujące się w dołku nr 6, brak otwartych próbek do elucji) spowoduje, że oprogramowanie powróci do ekranu „Konfiguracja kasety”, a problematyczne pozycje zostaną oznaczone wykrzyknikiem w czerwonym okręgu. Dotknąć wykrzyknika, aby uzyskać opis błędu i rozwiązać problemy związane z błędami. Ponownie dotknąć przycisku **Rozpocznij**, aby powtórzyć skanowanie stojaków na kartridże i rozpocząć przebieg ekstrakcji.

7. Urządzenie Maxwell® Instrument natychmiast rozpocznie cykl oczyszczania. Na ekranie będą wyświetlone wykonywane czynności oraz przybliżony czas pozostały do zakończenia przebiegu.

Uwagi:

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

Koniec przebiegu

9. Po zakończeniu metody postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie, aby otworzyć drzwi. Sprawdzić, czy tłoczki znajdują się w studzience #6 kartridża po zakończeniu przebiegu. Jeśli tłoczki nie zostaną usunięte ze słupka tłoczków, należy postępować zgodnie z wytycznymi przedstawionymi w instrukcji obsługi określonego urządzenia Maxwell® Instrument (patrz Tabela 1), aby przeprowadzić procedurę **Czyszczenie** i podjąć próbę rozładunku tłoczków.
10. Wyjąć stojaki na kartridże z urządzenia natychmiast po zakończeniu cyklu, aby zapobiec odparowaniu eluatów. Wyjąć próbówki do elucji zawierające ccfDNA i zatkać próbówki.
Przed uruchomieniem protokołu odkażania UV należy upewnić się, że oczyszczone próbki kwasów nukleinowych zostały wyjęte z aparatu, aby uniknąć uszkodzenia kwasów nukleinowych.
11. Wyjąć kartridże i tłoczki z tac białych Maxwell®. Zutyliżować je jako odpady niebezpieczne zgodnie z procedurami obowiązującymi w instytucji. Nie wolno ponownie używać kartridży Maxwell® CSC Cartridges, tłoczków CSC/RSC Plungers ani próbek Elution Tubes.



8. Czynności po zakończeniu oczyszczania

Ustalić, czy uzysk próbki oczyszczonego ccfDNA spełnia wymogi wejściowe dla odpowiedniego oznaczenia diagnostycznego przed ich wykorzystaniem w tym oznaczeniu. Jeśli oczyszczone próbki ccfDNA nie zostaną natychmiast opracowane, należy przechowywać próbki ccfDNA w temperaturze 4°C przez maksymalnie 7 dni. W przypadku dłuższego przechowywania należy zamrozić w temperaturze –20°C lub –70°C i niższej. Zapoznać się z instrukcjami dotyczącymi dalszych aplikacji, które zawierają szczegółowe zalecenia dotyczące przechowywania i postępowania z próbkami ccfDNA.

9. Ocena wydajności analitycznej

Wydajność analityczną zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit oceniono na podstawie próbek osocza ludzkiego przetworzonych w aparatach Maxwell® CSC i Maxwell® CSC 48 Instruments. W celu potwierdzenia niezawodności i przydatności ccfDNA wyekstrahowanego przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit do dalszych zastosowań, oceniono kluczowe wskaźniki, takie jak ilość, jakość, zdolność do amplifikacji, odtwarzalność i zanieczyszczenie krzyżowe ccfDNA.

9.A. Ilość i jakość ccfDNA

Próbki osocza wyizolowano z krwi sześciu osób pobranych do próbek K₂EDTA lub urządzeń Streck Cell-Free DNA BCT®. ccfDNA wyekstrahowano z 1–4 ml próbek osocza za pomocą zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit. Ilość i jakość ccfDNA oceniono za pomocą analizy TapeStation (Agilent Technologies, Inc.) jednego biologicznego replikatu na warunek, koncentrując się na procencie DNA wolnego od komórek (cfDNA) i wielkości największego piku DNA, który odzwierciedla jakość fragmentu. Procent cfDNA odnosi się do stosunku fragmentów DNA w zakresie 50–700 bp w stosunku do całkowitej zawartości DNA w oczyszczonej próbce, jak określono w analizie TapeStation. Wartość ta stanowi miarę wzbogacenia próbki w ccfDNA, który zazwyczaj ma mniejszy rozmiar ze względu na jego pochodzenie z pofragmentowanego DNA uwalnianego po śmierci komórki.

9.A. Ilość i jakość ccfDNA (ciąg dalszy)

Analiza TapeStation wykazała, że procentowy zakres cfDNA wynosił 76–93%, z największymi rozmiarami pików między 177 bp a 203 bp we wszystkich oczyszczonych próbkach ccfDNA. Nie stwierdzono znaczących różnic w proporcji lub jakości ccfDNA wyekstrahowanego z osocza zebranego w różnych probówkach z antykoagulantem lub różnych objętościach wejściowych próbek osocza.

Tabela 3. Analiza TapeStation oczyszczonego ccfDNA pokazująca procent wolnego od komórek DNA i największy rozmiar pików w różnych objętościach wejściowych próbek osocza i antykoagulantów.

Identyfikator próbki (antykoagulant)	Objętość wejściowa próbki osocza (ml)	Procent DNA wolnego od komórek	Największy rozmiar piku (bp)
1 (K ₂ EDTA)	1,0	81	186
	1,5	79	181
	3,0	80	183
	4,0	79	183
2 (K ₂ EDTA)	1,0	81	177
	1,5	88	178
	3,0	84	179
	4,0	91	175
3 (K ₂ EDTA)	1,0	90	184
	1,5	90	187
	3,0	89	183
	4,0	88	185
4 (Streck)	1,0	93	195
	1,5	76	200
	3,0	89	193
	4,0	84	192
5 (Streck)	1,0	92	195
	1,5	92	197
	3,0	90	195
	4,0	89	194
6 (Streck)	1,0	89	183
	1,5	79	182
	3,0	86	203
	4,0	86	203

9.B. Amplifikacja i inhibicja (substancje zakłócające)

Zdolność oczyszczonego ccfDNA do amplifikacji i brak inhibicji oceniono za pomocą testu qPCR do amplifikacji docelowego DNA 75 bp i analizy danych qPCR pod kątem jakiegokolwiek inhibicji. ccfDNA ekstrahowano w czterech powtórzeniach z każdej z 4 ml próbek ludzkiego osocza pobranych od sześciu osób w probówkach K₂EDTA lub urządzeniach Streck Cell-Free DNA BCT®. Każda wyekstrahowana próbka ccfDNA została przeanalizowana za pomocą testu qPCR. Średnie wartości wewnętrznej kontroli pozytywnej (IPC) $|\Delta C_q|$ obliczono względem standardu qPCR, którego stężenie było najbliższe stężeniu próbki ccfDNA amplifikowanej qPCR w celu określenia stopnia inhibicji.

Wyniki qPCR (Tabela 4) wskazywały na minimalną lub brak inhibicji amplifikacji, o czym świadczą średnie wartości IPC $|\Delta C_q| \leq 0,5$ dla wszystkich oczyszczonych próbek ccfDNA.

Tabela 4. Ocena inhibicji poprzez amplifikację ccfDNA wyekstrahowanego z 4 ml próbek ludzkiego osocza.

Identyfikator próbki (antykoagulant)	Średnie IPC $ \Delta C_q $
1 (K ₂ EDTA)	0,2
2 (K ₂ EDTA)	0,2
3 (K ₂ EDTA)	0,4
4 (Streck)	0,5
5 (Streck)	0,3
6 (Streck)	0,3

9.C. Ilościowe oznaczanie ccfDNA za pomocą barwnika fluorescencyjnego i qPCR

Spójność ilościowego oznaczenia ccfDNA oceniano, porównując stężenia ccfDNA przy użyciu metody opartej na swoistym dla dwuniciowego DNA barwnika fluorescencyjnego i testu qPCR, który amplifikował docelowy DNA o długości 75 bp. Do analiz użyto próbek ccfDNA wyekstrahowanych w czterech powtórzeniach z 4 ml próbek osocza ludzkiego pobranych od sześciu osób do probówek K₂EDTA lub urządzenia Streck Cell-Free DNA BCT®. Obliczono stosunek kwantyfikacji ccfDNA opartej na fluorescencji do kwantyfikacji ccfDNA opartej na qPCR.

Wyniki wykazały silną korelację między dwiema metodami kwantyfikacji, przy współczynnikach stężenia ccfDNA w zakresie od 0,7 do 1,4 we wszystkich próbkach.

Tabela 5. Porównanie stężenia ccfDNA przy użyciu metod ilościowych opartej na fluorescencji i qPCR.

Identyfikator próbki (antykoagulant)	Stosunek fluorescencji do stężenia qPCR
1 (K ₂ EDTA)	0,7
2 (K ₂ EDTA)	1,3
3 (K ₂ EDTA)	0,9
4 (Streck)	1,3
5 (Streck)	0,9
6 (Streck)	1,4

9.D. Odtwarzalność

Odtwarzalność ekstrakcji ccfDNA przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit została oceniona poprzez analizę procentowego współczynnika zmienności (CV) wewnątrz i między seriami dla wydajności ccfDNA. Używając 4 ml osocza zebranego w antykoagulancie K₂EDTA, ccfDNA ekstrahowano za pomocą trzech kolejnych serii ekstrakcji za pomocą urządzeń Maxwell® CSC i Maxwell® CSC 48 Instrument. Każdy cykl ekstrakcji dawał 24 eluaty ccfDNA. Wydajność ccfDNA została określona ilościowo przy użyciu testu qPCR, który amplifikował 75 bp docelowego DNA.

Wyniki wykazały, że procentowe wartości CV wewnątrz serii wynosiły odpowiednio 11% i 14% dla Maxwell® CSC Instrument i Maxwell® CSC 48 Instrument. Między seriami procentowe wartości CV wynosiły 5% dla obu instrumentów.

Tabela 6. Zmienność wewnątrz serii i między seriami w wydajności ccfDNA.

Urządzenie	Antykoagulant	Objętość wejściowa próbki osocza (ml)	Procentowy współczynnik zmienności wewnątrz serii.	Procentowy współczynnik zmienności między seriami.
Maxwell® CSC	K ₂ EDTA	4	11%	5%
Maxwell® CSC 48	K ₂ EDTA	4	14%	5%

9.E. Zanieczyszczenie krzyżowe

Potencjalne zanieczyszczenie krzyżowe podczas ekstrakcji ccfDNA przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit oceniano poprzez przetwarzanie próbek osocza ludzkiego i bydlęcego umieszczonych w naprzemiennych pozycjach pokładu urządzeń Maxwell® CSC i Maxwell® CSC 48. Eluaty ccfDNA z osocza bydlęcego analizowano pod kątem obecności jakiegokolwiek zanieczyszczającego ludzkiego DNA przy użyciu testu qPCR, który amplifikował specyficzny dla człowieka docelowy DNA 75 bp w celu określenia jakiegokolwiek zanieczyszczenia krzyżowego.

Gdy próbki osocza ludzkiego były przetwarzane w pozycjach platformy aparatu Maxwell® przylegających do próbek osocza wołowego, żaden z wołowych eluatów ccfDNA nie wykazywał policzalnych ilości ludzkiego DNA w teście qPCR, co potwierdza brak wykrywalnego zanieczyszczenia krzyżowego.

9.F. Kompatybilność z sekwencjonowaniem nowej generacji

Kompatybilność eluatu ccfDNA z procedurami sekwencjonowania nowej generacji (NGS) oceniano poprzez przygotowanie biblioteki ccfDNA, a następnie analizę TapeStation. ccfDNA ekstrahowano z próbek osocza zebranych w probówkach K₂EDTA lub urządzeniach Streck Cell-Free DNA BCT® przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit z Maxwell® CSC lub Maxwell® CSC 48 Instrument. Pomyślne przygotowanie biblioteki zostało określone przez zaobserwowanie charakterystycznego przesunięcia pary zasad adaptera w analizie TapeStation.

Wszystkie oceniane biblioteki ccfDNA wykazały oczekiwane przesunięcie par zasad adaptera, potwierdzając udane przygotowanie biblioteki NGS.

9.G. Kompatybilność z cyfrowym PCR

Kompatybilność eluatów ccfDNA z procedurą cyfrowego PCR (dPCR) oceniono przy użyciu testu cyfrowego PCR w kropli. Badanie obejmowało próbki ccfDNA wyekstrahowane z ludzkiego osocza zebrane zarówno w probówkach K₂EDTA, jak i urządzeniach Streck Cell-Free DNA BCT®, z objętościami wejściowymi próbek osocza 3 ml i 4 ml. eluaty ccfDNA oceniano za pomocą testu zmienności liczby kopii (gen PIK3CA) i rejestrowano liczbę kropli.

Wyniki wykazały udaną amplifikację we wszystkich testowanych próbkach ccfDNA, z liczbą kropli przekraczającą 15 000 na reakcję.

10. Ocena wydajności klinicznej

Wydajność kliniczną zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit oceniono w zewnętrznym laboratorium klinicznym na podstawie próbek osocza ludzkiego przetworzonych w aparacie Maxwell® CSC 48 Instrument.

W pierwszym badaniu dwóch testerów niezależnie oczyściło ccfDNA z 1,5 ml próbek ludzkiego osocza (n = 10) przy użyciu zarówno zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit, jak i standardowej metody oczyszczania stosowanej przez laboratorium jako odniesienie. Uzyskane eluaty ccfDNA analizowano pod kątem czynnika Rhesus przy użyciu testu opartego na amplifikacji. ccfDNA wyekstrahowany z próbek ludzkiego osocza przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit wykazał oczekiwane wyniki, które były zgodne z wynikami uzyskanymi z ccfDNA wyekstrahowanego przy użyciu laboratoryjnej metody referencyjnej.

W drugim badaniu dwóch testerów niezależnie oczyściło ccfDNA z 1,5 ml próbek osocza ludzkiego (n = 10) przy użyciu zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit. Oczyszczone eluaty ccfDNA analizowano pod kątem czynnika Rhesus przy użyciu testu opartego na amplifikacji i uzyskano zgodne wyniki między dwoma testerami.

11. Uwagi dotyczące pracy z ccfDNA

11.A. Przygotowanie osocza

Jednym z potencjalnych problemów podczas oczyszczania ccfDNA jest obecność zanieczyszczającego genomowego DNA z lizowanych białych krwinek. Osocze jest zwykle odwirowywane dwukrotnie. Pierwsze wirowanie usuwa czerwone i białe krwinki, a drugie wirowanie usuwa wszelkie pozostałości białych krwinek. Jeśli próbka krwi była inkubowana przez dłuższy czas w temperaturze pokojowej lub została zamrożona i rozmrożona przed przetworzeniem, niektóre białe krwinki mogły ulec lizie, uwalniając genomowe DNA do osocza.

Jeśli próbka osocza została zamrożona, po rozmrożeniu może być obecny krioprecypitat. Chociaż krioprecypitat nie ma wpływu na oczyszczanie ccfDNA za pomocą zestawu Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit, może on wpływać na pipetowanie osocza. Aby oddzielić krioprecypitat, odwirować próbkę osocza z prędkością $\geq 1000 \times g$ przez ≥ 5 minut przed przetworzeniem.

11.B. Zalecenia dotyczące ilościowego oznaczania ccfDNA

Niskie stężenie i fragmentaryczny charakter ccfDNA stanowią wyjątkowe wyzwanie. W osoczu pochodzącym od zdrowych ludzi typowa jest wydajność 5–30 ng ccfDNA na mililitr osocza. Większość fragmentów ccfDNA ma około 160–200 bp, z dodatkowymi fragmentami o długości około 340 bp i 510 bp.

Oznaczanie ilościowe UV

Dokładne określenie stężenia ccfDNA przy użyciu absorbancji 260 nm jest trudne ze względu na niskie stężenie. Niektóre produkty wykorzystują nośnikowy RNA w celu poprawy oczyszczania ccfDNA. Nośnikowy RNA występuje w znacznie większej ilości niż ccfDNA i współoczsza się. Może to dać fałszywą wartość A_{260} i drastycznie wyższe pozorne stężenia ccfDNA. W celu dokładnego oznaczenia ilościowego należy użyć barwników fluorescencyjnych lub PCR.

Kwantyfikacja oparta na fluorescencji

Wysoka czułość barwników specyficznych dla dwuniciowego DNA sprawia, że są one lepszym wyborem do ilościowego oznaczania ccfDNA, ale istnieją dwa problemy. Pierwszy z nich dotyczy nośnikowego RNA. Podczas gdy barwniki specyficzne dla dwuniciowego DNA mają znacznie większą specyficzność dla DNA niż RNA, wysokie poziomy nośnikowego RNA w innych zestawach ccfDNA mogą zawyżać względne wartości jednostek fluorescencji (RFU), sprawiając, że stężenia ccfDNA wydają się wyższe niż jego rzeczywiste stężenia.

Drugim czynnikiem jest to, że standardy stosowane z barwnikami fluorescencyjnymi są zazwyczaj genomowym DNA o wysokiej masie cząsteczkowej lub DNA Lambda. ccfDNA jest wysoce rozdrobniony i ma stosunkowo niską masę cząsteczkową. Dlatego nie wiąże on barwników fluorescencyjnych tak skutecznie jak DNA o wysokiej masie cząsteczkowej, co prowadzi do niższych stężeń pozornych. Jeśli to możliwe, użyć wzorców DNA o niższej masie cząsteczkowej, aby uzyskać dokładniejsze oznaczenie ilościowe.

Kwantyfikacja oparta na amplifikacji

Zarówno qPCR, jak i cyfrowe PCR zapewniają najdokładniejszą kwantyfikację ccfDNA. Oprócz czułości, kwantyfikacja oparta na amplifikacji może wskazywać przydatność próbek do dalszych zastosowań opartych na amplifikacji.

12. Rozwiązywanie problemów

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

www.promega.com. E-mail: **techserv@promega.com**

Objawy

Przyczyny i komentarze

Urządzenie nie jest w stanie podnieść tłoczków	Upewnić się, że używany jest zestaw odczynników Maxwell® CSC; tłoczki zestawów Maxwell® CSC są przeznaczone do obsługiwanych narzędzi Maxwell® Instruments (patrz Tabela 1).
Niski uzysk ccfDNA	Zestaw Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit może zaakceptować maksymalnie 4 ml próbki osocza. Powtórzyć ekstrakcję, używając do 4 ml osocza. Jeśli użyje się mniej niż 1 ml osocza, może to mieć negatywny wpływ na odzysk ccfDNA. Potwierdzić, że do studzienki #4 kartridża dodano odpowiednią objętość roztworu proteinazy K (PK2). Powtórzyć ekstrakcję po wlaniu 10 µl roztworu proteinazy K (PK2) do studzienki #4. Uzyski można zmniejszyć w przypadku elucji w objętości mniejszej niż 50 µl buforu Elution Buffer (RCFD). Powtórzyć ekstrakcję używając 50 µl buforu Elution Buffer (RCFD). Dostarczony bufor Elution Buffer (RCFD) jest niezbędny do skutecznego odzyskiwania ccfDNA. Nie zastępować buforu Elution Buffer (RCFD) alternatywnymi buforami elucyjnymi. Powtórzyć ekstrakcję przy użyciu buforu Elution Buffer (RCFD). Upewnić się, że osocze zostało przeniesione do odpowiednich studzienek kasety Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge (patrz Tabela 2 i Rysunek 1 w Rozdziale 6). - Aby uzyskać objętości wejściowe osocza wynoszące 1,0–1,5 ml, przenieść całe osocze do studzienki #1. - W przypadku objętości wejściowej osocza 1,5–3,0 ml, podzielić objętość osocza po równo między studzienki #1 i #3. - Aby uzyskać objętości wejściowe osocza w zakresie 3,0 ml–4,0 ml, dodać równe objętości osocza do studzienek #1, #2 i #3.
Zanieczyszczenie genomowym DNA	Preparat osocza zawiera zlizowane białe krwinki. Zalecenia dotyczące przygotowywania próbek osocza z krwi pełnej znajdują się w Rozdziałach 5 i 11.A.

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

13. Powiązane produkty

Produkt	Ilość	Nr kat.
Maxwell® CSC Instrument*	1 szt.	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 szt.	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 szt.	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 szt.	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 szt.	AS8402
RSC/CSC Plungers	50 szt./zestaw	AS1331
Elution Tubes (0,5 ml)	50 szt./zestaw	AS6201
Elution Magnet, 16 pozycji	1 szt.	AS4017
Elution Magnet, 24 pozycje	1 szt.	AS4018

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

Zestawy odczynników Maxwell® CSC

Listę dostępnych zestawów do ekstrakcji Maxwell® CSC można znaleźć na stronie www.promega.com.

© 2025 Promega Corporation. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Maxwell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Promega Corporation.

Cell-Free DNA BCT jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Streck LLC.

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

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

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