

cobas[®] DNA Sample Preparation Kit

Určené na diagnostické použitie *in vitro*



cobas[®] DNA Sample Preparation Kit

24 Tests

M/N: 05985536190

OBSAH

Účel použitia	3
Princípy procedúry.....	3
Príprava vzorky.....	3
Materiály a činidlá	4
Poskytované materiály a činidlá	4
Skladovanie činidiel a manipulácia s nimi.....	7
Ďalšie vyžadované materiály.....	7
Preventívne opatrenia a požiadavky na manipuláciu.....	8
Výstrahy a preventívne opatrenia	8
Vhodné laboratórne postupy.....	8
Kontaminácia.....	9
Integrita	9
Likvidácia.....	9
Rozliate látky a čistenie.....	9
Odber, preprava a skladovanie vzoriek	10
Odber vzoriek a manipulácia s nimi.....	10
Preprava, skladovanie a stabilita vzoriek	10
Skladovanie a stabilita spracovaných vzoriek.....	10
Súpravy na prípravu vzoriek	10
Používanie súpravy	10
Návod na použitie	10
Kvantifikácia DNA.....	13
Ďalšie informácie	14
Symboly	14
Technická podpora	15
Výrobca a distribútor.....	15
Ochranné známky a patenty.....	15
Autorské práva.....	15
Referenčné materiály	15
Revízia dokumentu	16

Účel použitia

cobas® DNA Sample Preparation Kit (Súprava na prípravu vzoriek DNA) slúži na manuálnu prípravu vzoriek na izolovanie genomickej DNA zo vzoriek tkaniva tumoru fixovaného formaldehydom a uchyteného v parafríne (FFPET).

Princípy procedúry

Príprava vzorky

Vzorky FFPET sa spracovávajú a genomické DNA sa izolujú pomocou cobas® DNA Sample Preparation Kit (Súpravy na prípravu vzoriek DNA) všeobecným manuálnym postupom prípravy vzorky na báze väzby nukleových kyselín na sklenené vlákna. Deparafinizovaná sekcia vzorky FFPET s veľkosťou 5 mikrónov (μm) sa rozkladá inkubáciou pri zvýšenej teplote a v prítomnosti proteázy a chaotropického dezintegračného/väzbového pufru, ktorý uvoľňuje nukleové kyseliny a chráni uvoľnenú genomickú DNA proti DNázam. Následne sa do dezintegračnej zmesi pridá izopropanol a dezintegračná zmes sa odstreďuje v kolónke s vložkou zo skleneného vlákna. Počas odstreďovania sa genomická DNA naviaže na povrch filtra zo sklenených vlákien. Nenaviazané látky, akými sú napríklad soli, proteíny a iné nečistoty, sa odstreďovaním odstránia. Adsorbované nukleové kyseliny sa prepláchnu a potom sa vylúhujú vodným roztokom. Množstvo genomickej DNA sa stanoví spektrofotometricky a upraví sa na fixnú koncentráciu.

Materiály a činidlá

Poskytované materiály a činidlá

Súprava/kazety	Súčasti a zložky činidiel	Množstvo na jeden test	Bezpečnostný symbol a varovanie ^a
cobas® DNA Sample Preparation Kit 24 testov (M/N: 05985536190)	DNA TLB (Pufor na dezintegráciu tkaniva DNA) (M/N: 05517613001) Tris-HCl pufor Chlorid draselný 0,04 % EDTA 0,1 % neiónový detergent ^b 0,09 % azid sodný	1 × 10 ml	N/A
	PK (Proteináza K) (M/N: 05860695102) Proteináza K, lyofilizovaná ^b	1 × 100 mg	 NEBEZPEČENSTVO H315: Dráždi pokožku. H317: Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu. H319: Spôsobuje vážne podráždenie očí. H334: Pri vdýchnutí môže vyvolať alergiu alebo príznaky astmy, alebo dýchacie ťažkosti. H335: Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest. P261: Zabráňte vdychovaniu prachu. P264: Po manipulácii starostlivo umyte pokožku. P280: Noste ochranné rukavice/ochranné okuliare/ochranu tváre. P284: Používajte ochranu dýchacích ciest. P304 + P340 + P312: PO VDÝCHNUTÍ: presuňte osobu na čerstvý vzduch a umožnite jej pohodlne dýchať. Pri zdravotných problémoch volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára. P342 + P311: Pri sťaženom dýchaní: Volajte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM/lekára. 39450-01-6 Proteináza, <i>Tritirachium album</i> sérín

Súprava/kazety	Súčasti a zložky činidiel	Množstvo na jeden test	Bezpečnostný symbol a varovanie ^a
cobas® DNA Sample Preparation Kit 24 testov (M/N: 05985536190)	DNA PBB (Pufor viažuci parafrín DNA) (M/N: 05517621001) Tris-HCl pufor 49,6 % guanidín hydrochlorid ^b 0,05 % močovina 20 % neiónový detergent ^b	1 × 10 ml	 VÝSTRAHA H302: Škodlivý po požití. H315: Dráždi pokožku. H319: Spôsobuje vážne podráždenie očí. H411: Toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami. P264: Po manipulácii starostlivo umyte pokožku. P273: Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia. P280: Noste ochranné rukavice/ochranné okuliare/ochranu tváre. P337 + P313: Ak podráždenie očí pretrváva: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť. P391: Zozbierajte uniknutý produkt. 50-01-1 Guanidínium chlorid 9002-92-0 Polidokanol
	WB I (Premývací pufor DNA I) (M/N: 05517656001) Tris-HCl pufor 64 % guanidín hydrochlorid ^b	1 × 25 ml	 VÝSTRAHA H302 + H332: Zdraviu škodlivý pri požití alebo vdýchnutí. H315: Dráždi pokožku. H319: Spôsobuje vážne podráždenie očí. P261: Zabráňte vdychovaniu hmly alebo pár. P264: Po manipulácii starostlivo umyte pokožku. P280: Noste ochranné rukavice/ochranné okuliare/ochranu tváre. P304 + P340 + P312: PO VDÝCHNUTÍ: presuňte osobu na čerstvý vzduch a umožnite jej pohodlne dýchať. Pri zdravotných problémoch volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára. P337 + P313: Ak podráždenie očí pretrváva: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť. P501: Zneškodnite obsah/nádobu v zariadení schválenom na likvidáciu odpadov. 50-01-1 Guanidínium chlorid

Súprava/kazety	Súčasti a zložky činidiel	Množstvo na jeden test	Bezpečnostný symbol a varovanie ^a
cobas® DNA Sample Preparation Kit 24 testov (M/N: 05985536190)	WB II (Premývací pufo DNA II) (M/N: 05517664001) Tris-HCl pufo Chlorid sodný	1 × 12,5 ml	N/A
	DNA EB (Elučný pufo DNA) (M/N: 05517630001) Tris-HCl pufo 0,09 % azid sodný	1 × 6 ml	N/A
	FT (Filtročné skúmavky s uzávermi) (M/N: 05089506102)	1 × 25 ks	N/A
	CT (Zberné skúmavky) (M/N: 05880513001)	3 × 25 ks	N/A

^a Označenie bezpečnosti výrobku sa riadi hlavne usmernením EÚ pre globálny harmonizovaný systém (GHS) klasifikácie a označovania chemikálií.

^b Nebezpečné látky.

Skladovanie činidiel a manipulácia s nimi

Činidlo	Teplota skladovania	Doba skladovania
cobas® DNA Sample Preparation Kit (Súprava na prípravu vzoriek DNA)	15 °C až 30 °C	Po otvorení je stabilná až na 8 použití v priebehu 90 dní alebo do doby expirácie, podľa toho, čo nastane skôr.

Poznámka: Okrem reagentie **PK** činidlá nezmrazujte.

Poznámka: Pred použitím vizuálne skontrolujte každé činidlo, aby ste sa uistili, že nedochádza k úniku. Ak činidlo uniká, tento materiál na testovanie nepoužívajte.

Po pridaní sterilnej vody bez obsahu nukleázy do **PK** uchovávajte nepoužitú rekonštituovanú reagentiu **PK** v 450 µl alikvótoch pri teplote –20 °C. Po rekonštituovaní sa **PK** musí použiť do 90 dní alebo do dátumu expirácie, podľa toho, čo nastane skôr. Po pridaní absolútneho etanolu uchovávajte **WB I** a **WB II** pri teplote 15 °C až 30 °C. Tieto pracovné roztoky sú stále počas 90 dní alebo do dátumu expirácie, podľa toho, čo nastane skôr.

Ďalšie vyžadované materiály

Materiály	P/N
Xylén (ACS, ≥ 98,5 % xylénov)	Ľubovoľný dodávateľ
Absolútny etanol (100 %, na použitie v oblasti molekulárnej biológie)	Ľubovoľný dodávateľ
Izopropanol (ACS, ≥ 99,5 %)	Ľubovoľný dodávateľ
Sterilná voda bez obsahu nukleázy (trieda na použitie v oblasti molekulárnej biológie)	Ľubovoľný dodávateľ
Chlórnan sodný (koncentrát)	Ľubovoľný dodávateľ
70 % etanol	Ľubovoľný dodávateľ
Sterilné jednorazové sérologické pipety 5 a 25 ml	Ľubovoľný dodávateľ
Nastaviteľné pipety* (s možnosťou pipetovania 5 – 1 000 µl)	Ľubovoľný dodávateľ
Pipetové špičky s aerosólovou bariérou alebo výtlakové pipetové špičky bez obsahu DNázy	Ľubovoľný dodávateľ
Pipet-Aid™*	Ľubovoľný dodávateľ
Stolová mikroadstredivka* (s otáčkami 20 000 × g)	Ľubovoľný dodávateľ
Dve zariadenia na tvorbu suchého tepla, ktoré zohrejú skúmavky do mikroadstredivky na 56 °C a 90 °C*	Ľubovoľný dodávateľ
Skúmavky do mikroadstredivky so zaisťovacím vekom (1,5 ml, sterilné, bez obsahu RNázy/DNázy, triedy PCR)	Ľubovoľný dodávateľ
Stojany na skúmavky do mikroadstredivky	Ľubovoľný dodávateľ
Spektrofotometer na meranie koncentrácie DNA*	Ľubovoľný dodávateľ
Vírivý mixér*	Ľubovoľný dodávateľ
Mraznička umožňujúca skladovanie pri teplote –25 °C až –15 °C	Ľubovoľný dodávateľ
Kalibrované teplomery pre zariadenie na tvorbu suchého tepla*	Ľubovoľný dodávateľ
Vodný kúpeľ* umožňujúci udržanie teploty 37 °C	Ľubovoľný dodávateľ
Jednočepeľový nôž a podobne	Ľubovoľný dodávateľ
Jednorazové rukavice bez obsahu púdru	Ľubovoľný dodávateľ

* Všetko vybavenie je potrebné riadne udržiavať podľa pokynov výrobcu.

Ďalšie informácie o osobitne predávaných materiáloch získate od miestneho zástupcu spoločnosti Roche.

Preventívne opatrenia a požiadavky na manipuláciu

Výstrahy a preventívne opatrenia

Ako pri každej testovacej procedúre, aj v tomto prípade platí, že základom správnej funkcie tejto súpravy na prípravu vzoriek je dodržanie osvedčených laboratórnych postupov.

- Iba na diagnostické použitie *in vitro*.
- Karty bezpečnostných údajov (SDS) sú k dispozícii na požiadanie od miestneho zastúpenia spoločnosti Roche.
- So všetkými vzorkami je potrebné manipulovať ako s infekčným materiálom a je potrebné používať bezpečné laboratórne postupy, napríklad postupy uvádzané v dokumente Biosafety in Microbiological Laboratories¹ a v dokumente CLSI M29-A4.²
- **DNA PBB** a **DNA TLB** obsahujú neiónový detergent dráždivý pre sliznice. Vyhybajte sa kontaktu s očami, pokožkou a sliznicami.

Poznámka: Komerčne dostupný tekutý bieliaci roztok obvykle obsahuje chlórnan sodný v koncentrácii 5,25 %. Roztok domáceho bielidla v pomere 1 : 10 znamená 0,5 % roztok chlórnanu sodného.

- Xylén je nebezpečná chemikália a musí sa používať pod digestorom. Zneškodňujte ako chemický odpad v súlade s platnými miestnymi a celoštátnymi predpismi.
- Odporúča sa použitie sterilných jednorazových pipiet a špičiek k pipetám neobsahujúcich Dnázy.
- Dôsledne dodržiavajte poskytnuté postupy a usmernenia, aby ste zabezpečili správnu prípravu vzoriek. Akákoľvek odchýlka od postupov a usmernení môže mať vplyv na optimálny priebeh testu.
- Informujte miestny kompetentný orgán a výrobcu o všetkých závažných udalostiach, ktoré sa môžu vyskytnúť pri používaní tohto testu.

Vhodné laboratórne postupy

- Pipetu nenapĺňajte pomocou úst.
- V pracovných oblastiach laboratória nejedzte, nepite ani nefajčite.
- Po ukončení práce so vzorkami a činidlami súpravy si dôkladne umyte ruky.
- Pri práci s každým činidlom používajte vhodné prostriedky na ochranu očí, laboratórne plášte a jednorazové rukavice. Zabráňte kontaktu týchto materiálov s kožou, očami a sliznicami. Ak dôjde ku kontaktu, zasiahnuté miesto ihneď umyte veľkým množstvom vody. V prípade neošetrenia môžu vzniknúť popáleniny. Ak dôjde k rozliatiu týchto činidiel, pred ich utretím do sucha ich zriedte vodou.
- Všetky pracovné povrchy v laboratóriu dôkladne vyčistite a vydezinfikujte pomocou čerstvo pripraveného 0,5 % roztoku chlórnanu sodného v deionizovanej alebo destilovanej vode (bežné domáce bielidlo zriedené v pomere 1 : 10). Následne pracovné povrchy utrite utierkou namočenou do 70 % etanolu.

Poznámka: Komerčne dostupný tekutý bieliaci roztok obvykle obsahuje chlórnan sodný v koncentrácii 5,25 %. Roztok domáceho bielidla v pomere 1 : 10 znamená 0,5 % roztok chlórnanu sodného.

Kontaminácia

- Je nevyhnutné nosiť rukavice a medzi manipuláciami s jednotlivými vzorkami a činidlami **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (Súpravy na prípravu vzoriek DNA) je potrebné rukavice meniť, aby nedošlo ku kontaminácii. Počas manipulácie so vzorkami dbajte na to, aby nedošlo ku kontaminácii rukavíc.
- Rukavice je potrebné často meniť, aby sa znížila potenciálna možnosť kontaminácie.
- Rukavice je potrebné meniť pred opustením oblasti izolácie DNA a v prípade, ak existuje podozrenie na kontakt s roztokmi alebo vzorkou.
- Dbajte na to, aby nedošlo k mikrobiálnej a ribonukleázovej kontaminácii činidiel.
- Materiál a vybavenie musia byť vyhradené na konkrétne činnosti a nesmú sa používať na iné činnosti, ani sa nesmú prenášať medzi jednotlivými miestami. Napríklad pipetory ani spotrebný materiál, ktoré sa používajú na izolovanie DNA, sa nesmú používať na prípravu činidiel na amplifikáciu a detekciu.
- Dôrazne odporúčame, aby mal postup prác v laboratóriu jednosmerný charakter, t. j. aby ste dokončili aktuálnu aktivitu a až po jej dokončení pokračovali ďalšou aktivitou. Napríklad izoláciu DNA je potrebné dokončiť pred začatím amplifikácie a detekcie. Izoláciu DNA je potrebné vykonávať v priestore oddelenom od amplifikácie a detekcie.

Integrita

- Nepoužívajte súpravy po uplynutí dátumu expirácie.
- Nemiešajte činidlá z rôznych šarží alebo súprav.
- Jednorazové položky nepoužívajte po uplynutí ich dátumu expirácie.
- Všetky jednorazové položky sú určené na jedno použitie. Nepoužívajte ich opakovane.
- Všetko zariadenie sa musí riadne udržiavať podľa pokynov príslušných výrobcov.

Likvidácia

- **DNA EB** a **DNA TLB** obsahujú azid sodný. Azid sodný môže reagovať s olovenými a medenými rozvodmi a môže dochádzať k tvorbe vysoko výbušných kovových azidov. Ak vylievate roztoky obsahujúce azid sodný do laboratórnych drezov, vypláchnite odvodné potrubia veľkým množstvom vody, čím zabránite ukladaniu azidov.
- Pri likvidácii nepoužitých činidiel a odpadu postupujte v súlade s platnými štátnymi a miestnymi predpismi.

Rozliate látky a čistenie

- **DNA PBB** a **WB I** obsahujú guanidín hydrochlorid. Ak dôjde k rozliatiu kvapaliny obsahujúcej tento pufer, zasiahnutý priestor vyčistíte laboratórnym detergentom a vodou. Ak rozliata kvapalina obsahuje potenciálne infekčné látky, zasiahnuté miesto najskôr vyčistíte laboratórnym detergentom a vodou a následne 0,5 % roztokom chlórnanu sodného.

Odber, preprava a skladovanie vzoriek

Poznámka: So všetkými vzorkami zaobchádzajte tak, ako keby boli schopné prenosu infekčných činiteľov.

Odber vzoriek a manipulácia s nimi

cobas® DNA Sample Preparation Kit (Súprava na prípravu vzoriek DNA) bola vyvinutá na použitie so vzorkami FFPET.

Preprava, skladovanie a stabilita vzoriek

Vzorky FFPET možno prepravovať pri teplote 15 °C až 30 °C. Pri preprave vzoriek FFPET musia byť splnené požiadavky štátnych, federálnych a miestnych predpisov na prepravu etiologických materiálov.³

Pokiaľ ide o odporúčania týkajúce sa skladovania, pozrite si časť **Odber, preprava a skladovanie vzoriek** v pokynoch na použitie špecifického testu.

Skladovanie a stabilita spracovaných vzoriek

Pokiaľ ide o odporúčania týkajúce sa skladovania, pozrite si časť **Odber, preprava a skladovanie vzoriek** v pokynoch na použitie špecifického testu.

Extrahovanú DNA je potrebné použiť v rámci odporúčanej doby skladovania alebo pred dátumom expirácie cobas® DNA Sample Preparation Kit (Súpravy na prípravu vzoriek DNA), ktorá sa používa na extrakciu DNA, podľa toho, čo nastane skôr.

Pred použitím extrahovaných zásobných DNA premiešajte elučnú skúmavku pulzným spôsobom pomocou vírivého mixéra a vykonajte odstredenie.

Súpravy na prípravu vzoriek

Používanie súpravy

Obrázok 1 Pracovný postup pre súpravu na prípravu vzoriek DNA cobas®

1	Vyberte vzorky a činidlá z priestoru, v ktorom ich uchováate.
2	Vykonajte odparafínovanie vzoriek.
3	Vykonajte izoláciu DNA.
4	Vykonajte vylúhovanie DNA.

Návod na použitie

Poznámka: cobas®DNA Sample Preparation Kit (Súprava na prípravu vzoriek DNA) bola vyvinutá na použitie so sekciami vzoriek FFPET s hrúbkou 5 mikrónov.

Poznámka: V prípade testov na detekciu mutácie môžu existovať osobitné požiadavky, pokiaľ ide o obsah tumoru a potrebu makrodisekcie po odparafínovaní.

Poznámka: Zariadenia na tvorbu suchého tepla na zohriatie skúmaviek do mikroodstredivky so zaistovacím vekom sa musia zapnúť a nastaviť na 56 °C a 90 °C.

Príprava a skladovanie reagensí

Pred prvým použitím súpravy pripravte pracovné reagensie podľa znázornenia v nasledujúcej tabuľke. Na dávkovanie vody použite 5 ml sérologickú pipetu. Na dávkovanie etanolu použite 25 ml sérologické pipety. Ak bola proteináza K už rekonštituovaná a zmrazená, rozmrazte dostatočný počet alikvôt pre spracovanie daného počtu vzoriek.

Činidlá	Rekonštituovanie/príprava
Proteináza K (PK)	Rekonštituujte PK pridaním 4,5 ml sterilnej vody bez obsahu nukleázy (triedy PCR) do liekovky pomocou sterilnejjednorazovej 5 ml sérologickej pipety. Premiešajte skúmavku prevracaním 5 až 10 krát. Naalikvotujte 450 µl rekonštituovanej PK do 1,5 ml skúmaviek do mikroadstredivky so zaistovacím vekom a uchovávajte pri –20 °C až 90 dní alebo do doby expirácie, podľa toho, čo nastane skôr. Ak bola PK už rekonštituovaná a zmrazená, rozmrazte dostatočný počet alikvôt pre spracovanie daného počtu vzoriek (na každú vzorku sa vyžaduje 70 µl rekonštituovanej PK).
Vymývací pufer I (WB I)	Pripravte pracovný vymývací pufer WB I pridaním 15 ml absolútneho etanolu do fľaše WB I . Premiešajte fľašu prevracaním 5 až 10 krát. Poznamenajte si na fľaši, že bol pridaný etanol, a dátum pridaní. Pracovný pufer WB I skladuje pri teplote 15 °C až 30 °C maximálne 90 dní alebo do dátumu expirácie, podľa toho, čo nastane skôr.
Vymývací pufer II (WB II)	Pripravte pracovný vymývací pufer WB II pridaním 50 ml absolútneho etanolu do fľaše WB II . Premiešajte fľašu prevracaním 5 až 10 krát. Poznamenajte si na fľaši, že bol pridaný etanol, a dátum pridaní. Pracovný pufer WB II skladuje pri teplote 15 °C až 30 °C maximálne 90 dní alebo do dátumu expirácie, podľa toho, čo nastane skôr.

Všetky roztoky uchovávané pri teplote 15 °C až 30 °C by mali byť číre. Ak sú v niektorom činidle prítomné usadeniny, roztok zohrejte vo vodnom kúpeli na 37 °C, kým sa usadenina nerozpustí. Nepoužívajte, kým sa nerozpustí všetka usadenina.

Odparafínovanie sekcií FFPET upevnených na sklíčkach

Poznámka: Xylén je nebezpečná chemikália. Všetky kroky odparafínovania by sa mali vykonávať pod digestorom. Pozri *Výstrahy a preventívne opatrenia*.

1. Sklíčko s upevnenou 5-mikrónovou FFPET sekciou preneste do nádoby s dostatočným množstvom xylénu na zakrytie tkaniva; namočte na 5 minút.
2. Preneste sklíčko do nádoby s dostatočným množstvom absolútneho etanolu na zakrytie tkaniva; namočte na 5 minút.
3. Vyberte sklíčko z etanolu a sekciu nechajte úplne vyschnúť na vzduchu (5 až 10 minút).
4. V prípade potreby vykonajte makrodisekciu.
5. Označte jednu 1,5 ml skúmavku do mikroadstredivky so zaistovacím vekom identifikačnými informáciami vzorky.
6. Pridajte 180 µl **DNA TLB** do 1,5 ml skúmavky do mikroadstredivky so zaistovacím vekom.
7. Pridajte 70 µl rekonštituovanej **PK** do skúmavky do mikroadstredivky so zaistovacím vekom, ktorá obsahuje **DNA TLB**.
8. Zotrite tkanivo zo sklíčka do skúmavky do mikroadstredivky so zaistovacím vekom. Ponorte tkanivo do zmesi **DNA TLB/PK**.
9. Pokračujte krokom 1 postupu izolácie DNA.

Odparafínovanie sekcií FFPET neupevnených na sklíčkach

Poznámka: Xylén je nebezpečná chemikália. Všetky kroky odparafínovania by sa mali vykonávať pod digestorom. Pozri časť *Výstrahy a preventívne opatrenia*.

Poznámka: Ak sa v prípade vzorky vyžaduje makrodisekcia, táto sekcia sa musí upevniť na sklíčko a musí sa dodržať postup uvedený v časti *Odparafínovanie sekcií FFPET upevnených na sklíčkach*.

1. Vložte jednu 5-mikrónovú sekciu FFPET do 1,5 ml skúmavky do mikroadstredivky so zaistovacím vekom označenej identifikačnými informáciami pre každú vzorku.
2. Pridajte 500 µl xylénu do skúmavky do mikroadstredivky so zaistovacím vekom, ktorá obsahuje sekciu FFPET.

3. Dôkladne premiešajte 10 sekúnd vo vírivom mixéri.
4. Nechajte skúmavku stáť 5 minút pri 15 °C až 30 °C.
5. Pridajte 500 µl absolútneho etanolu a obsah zmiešajte vo vírivom mixéri 10 sekúnd.
6. Nechajte skúmavku stáť 5 minút pri 15 °C až 30 °C.
7. Odstreďujte pri rýchlosti 16 000 × g až 20 000 × g po dobu 2 minút. Odstráňte supernatant bez toho, aby ste poškodili sediment. Supernatant zlikvidujte do chemického odpadu.
8. Pridajte 1 ml absolútneho etanolu a obsah miešajte vo vírivom mixéri 10 sekúnd.
9. Odstreďujte pri rýchlosti 16 000 × g až 20 000 × g po dobu 2 minút. Odstráňte supernatant bez toho, aby ste poškodili sediment. Supernatant zlikvidujte do chemického odpadu.
10. Ak peleta pláva vo zvyšnom supernatante, odstredzte ju znova 1 minútu pri 16 000 × g až 20 000 × g. Odstráňte všetok zvyšný supernatant.
11. Suchú peletu tkaniva sušte po dobu 10 minút pri teplote 56 °C v zariadení na tvorbu tepla s otvorenou skúmavkou.
12. Skôr ako prejdete k ďalšiemu kroku, uistite sa, že sa etanol úplne odparil a že je peleta suchá.
13. V prípade potreby možno suché pelety skladovať až 24 hodín pri teplote 2 °C až 8 °C.
14. Resuspendujte peletu tkaniva v 180 µl **DNA TLB**.
15. Pridajte 70 µl rekonštituovanej **PK**.
16. Pokračujte krokom 1 nasledujúce časti: **Postup izolácie DNA**.

Postup izolácie DNA

Poznámka: Ak sa to v prípade testu vyžaduje, negatívnu kontrolu spracováajte súčasne so vzorkou (-ami). Pripravte negatívne kontroly skombinovaním 180 µl **DNA TLB** a 70 µl **PK** v 1,5 ml skúmavke do mikroadstredivky so zaistovacím vekom označenej ako **NEG**. Negatívne kontroly sa musia spracovať rovnakým postupom ako vzorky.

1. Skúmavky obsahujúce zmes vzorky/**DNA TLB/PK** a zmes negatívnej kontroly (**NEG**) miešajte 30 sekúnd vo vírivom mixéri.

Poznámka: Tkanivo musí byť úplne ponorené do zmesi **DNA TLB/PK**.

2. Skúmavky vložte do zariadenia na tvorbu suchého tepla pri teplote 56 °C a inkubujte 60 minút.
3. Skúmavky miešajte 10 sekúnd vo vírivom mixéri.

Poznámka: Tkanivo musí byť úplne ponorené do zmesi **DNA TLB/PK**.

4. Skúmavky vložte do zariadenia na tvorbu suchého tepla pri teplote 90 °C a inkubujte 60 minút.

Poznámka: Počas inkubácie pripravte požadovaný počet filtračných skúmaviek (**FT**) s odklápacími uzávermi tak, že skúmavku **FT** vložíte do zbernej skúmavky (**CT**) a označíte každý uzáver skúmavky **FT** identifikáciou samotnej vzorky alebo kontroly.

Poznámka: Každá vzorka si bude vyžadovať 1 skúmavku **FT**, 3 skúmavky **CT** a 1 elučnú skúmavku (1,5 ml skúmavka do mikroadstredivky so zaistovacím vekom).

Poznámka: Počas inkubácie označte požadovaný počet elučných skúmaviek (1,5 ml skúmavka do mikroadstredivky so zaistovacím vekom) identifikačnými informáciami samotnej vzorky alebo kontroly.

5. Skúmavky nechajte vychladnúť na 15 °C až 30 °C. Po ochladení skúmavky impulzovo odstredzte, aby sa z uzáverov zozbierala tekutina.
6. Pridajte 200 µl **DNA PBB** do každej skúmavky, premiešajte ju trojnásobným napipetovaním nahor a nadol.
7. Vykonaajte inkubáciu 10 minút pri teplote 15 °C až 30 °C.

8. Pridajte do každej skúmavky 100 µl izopropanolu, lyzát premiešajte trojnásobným napipetovaním nahor a nadol.
9. Preneste všetky lyzáty do vhodne označenej jednotky FT/CT.
10. Jednotky FT/CT odstreďte rýchlosťou $8\,000 \times g$ po dobu 1 minúty.
11. Každú skúmavku FT vložte do novej skúmavky CT. Zlikvidujte prietokovú frakciu zo starej skúmavky CT ako chemický odpad a riadne zlikvidujte použitú skúmavku CT.
12. Pridajte 500 µl pracovného WB I do každej skúmavky FT

Poznámka: *Príprava pracovného WB I je popísaná v časti Príprava činidla.*

13. Jednotky FT/CT odstreďte rýchlosťou $8\,000 \times g$ po dobu 1 minúty.
14. Prietokovú frakciu v každej skúmavke CT zlikvidujte ako chemický odpad. Skúmavku FT vložte späť do tej istej skúmavky CT.
15. Pridajte 500 µl pracovného WB II do každej skúmavky FT.

Poznámka: *Príprava pracovného WB II je popísaná v časti Príprava činidla.*

16. Jednotky FT/CT odstreďte rýchlosťou $8\,000 \times g$ po dobu 1 minúty.
17. Každú skúmavku FT vložte do novej skúmavky CT. Zlikvidujte prietokovú frakciu zo starej skúmavky CT ako chemický odpad a riadne zlikvidujte použitú skúmavku CT.
18. Jednotky FT/CT odstreďte 1 minútu rýchlosťou $16\,000$ až $20\,000 \times g$, aby sa vysušili filtračné membrány.
19. Vložte každú skúmavku FT do elučnej skúmavky (1,5 ml skúmavka do mikroadstredivky so zaisťovacím vekom) vopred označenej identifikačnými informáciami vzorky alebo kontroly. Zlikvidujte prietokovú frakciu z použitej skúmavky CT ako chemický odpad a riadne zlikvidujte použitú skúmavku CT.
20. Pridajte 100 µl DNA EB do stredu každej membrány FT bez dotyku membrány FT.
21. Vykonajte inkubáciu skúmavky FT s elučnou skúmavkou počas 5 minút pri teplote $15\,^{\circ}\text{C}$ až $30\,^{\circ}\text{C}$.
22. Skúmavku FT odstreďte 1 minútu s elučnou skúmavkou rýchlosťou $8\,000 \times g$, aby sa eluát zozbieral do elučnej skúmavky. Použitú skúmavku FT správne zlikvidujte.
23. Uzavrite uzáver elučnej skúmavky. Elučná skúmavka obsahuje zásobnú DNA.
24. Na účely kvantifikácie DNA prejdite k časti **Kvantifikácia DNA**.

Poznámka: *Meranie koncentrácie DNA by sa malo uskutočniť bezprostredne po izolácii DNA a pred uskladnením.*

Kvantifikácia DNA

1. Každú zásobnú skúmavku DNA premiešajte vo vírivom mixéri po dobu 5 sekúnd.
2. DNA kvantifikujte pomocou spektrofotometra podľa protokolu výrobcu. DNA EB použite pre tento prístroj ako slepú vzorku. Potrebný je priemer dvoch konzistentných zobrazovaných údajov.

Poznámka: *Tieto dve merania by mali byť v rozmedzí $\pm 10\%$ od seba, ak sú hodnoty koncentrácie DNA $\geq 20,0\text{ ng}/\mu\text{l}$. Pri hodnotách koncentrácie DNA $< 20,0\text{ ng}/\mu\text{l}$ by tieto dve merania mali byť v rozmedzí $\pm 2\text{ ng}/\mu\text{l}$. Ak tieto dve merania nie sú v rámci $\pm 10\%$ od seba pri hodnotách koncentrácie DNA $\geq 20,0\text{ ng}/\mu\text{l}$ alebo v rámci $\pm 2\text{ ng}/\mu\text{l}$ pri hodnotách koncentrácie DNA $< 20,0\text{ ng}/\mu\text{l}$, musia byť určené ďalšie 2 hodnoty, kým nebudú tieto požiadavky splnené. Potom je potrebné vypočítať priemer z týchto dvoch nových meraní.*

Poznámka: *Ak sa vyžaduje úplná spracovaná negatívna kontrola (NEG), zásobnú DNA pre NEG nie je potrebné merať.*

Poznámka: *Amplifikácia uskladnenej extrahovanej DNA musí prebehnúť v rámci odporúčaných období skladovania v pokynoch na použitie špecifických pre analýzu alebo pred dátumom expirácie cobas® DNA Sample Preparation Kit (Súpravy na prípravu vzoriek DNA), ktorá sa používa na extrakciu DNA, podľa toho, čo nastane skôr.*

Poznámka: *Koncentráciu DNA požadovanú na testovanie si pozrite v pokynoch na použitie špecifických pre analýzu.*

Ďalšie informácie

Symbols

Na označenie diagnostických produktov Roche PCR sa používajú nasledujúce symboly.

Tab. 1 Symboly používané na označenie diagnostických produktov Roche PCR

 Age/DOB Vek alebo dátum narodenia	 Pomôcka nie je určená na testovanie v blízkosti pacienta	 QS IU/PCR Počet medzinárodných jednotiek QS na PCR; na výpočet výsledkov použite počet medzinárodných jednotiek (IU) QS na PCR.
 SW Prídavný softvér	 Pomôcka nie je určená na samotestovanie	 SN Sériové číslo
 Assigned Range [copies/mL] Priradený rozsah (kópie/ml)	 Distribútor (Poznámka: Pod symbolom sa môže uviesť príslušná krajina/oblasť)	 Site Lokalita
 Assigned Range [IU/mL] Priradený rozsah (IU/ml)	 Nepoužívajte opakovane	 Procedure Standard Štandardná procedúra
 EC REP Autorizované zastúpenie v Európskom spoločenstve	 Žena	 STERILE EO Sterilizované etylénoxidom
 BARCODE Dátový list s čiarovým kódom	 Určené len na hodnotenie výkonu IVD	 Skladovať v tmavom prostredí
 LOT Číslo šarže	 GTIN Globálne číslo obchodnej jednotky	 Teplotné rozmedzie od do
 Biologické riziká	 Dovozca	 TDF Testovací definičný súbor
 REF Katalógové číslo	 IVD Diagnostická zdravotnícka pomôcka <i>in vitro</i>	 Týmto smerom hore
 Označenie súladu s normami CE: toto zariadenie spĺňa príslušné požiadavky na označenie CE ako diagnostické zdravotnícke zariadenie <i>in vitro</i> .	 LLR Dolný limit stanoveného rozsahu	 Procedure UltraSensitive Ultracitlivá procedúra
 Collect Date Dátum odberu	 Muž	 UDI Jedinečná identifikácia pomôcky
 Prečítajte si návod na použitie	 Výrobca	 ULR Horný limit stanoveného rozsahu
 Obsah postačuje na <n> testov	 CONTROL - Negatívna kontrola	 Urine Fill Line Čiara naplnenia močom
 CONTENT Obsah súpravy	 NON STERILE Nesterilné	 Rx Only Len pre USA: federálny zákon obmedzuje predaj tejto pomôcky lekárom alebo na základe jeho predpisu.
 CONTROL Kontrola	 ? Meno pacienta	 Expiry date Dátum spotreby
 Dátum výroby	 # Číslo pacienta	
 Pomôcka na testovanie v blízkosti pacienta	 Tu stiahnite	
 Pomôcka na samotestovanie	 CONTROL + Pozitívna kontrola	
	 QS copies / PCR Počet QS kópií na PCR reakciu, použite počet QS kópií na PCR reakciu na výpočet výsledkov.	

Technická podpora

Ak potrebujete technickú podporu (pomoc), obráťte sa na miestne zastúpenie:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Výrobca a distribútor

Tab. 2 Výrobca a distribútor



Roche Diagnostics GmbH
 Sandhofer Strasse 116
 68305 Mannheim, Germany
www.roche.com

Vyrobené v USA

Distributed by Roche Diagnostics
 9115 Hague Road
 Indianapolis, IN 46250-0457 USA
 (For Technical Assistance call the
 Roche Response Center
 toll-free: 1-800-526-1247)¹

¹ Len pre USA.

Ochranné známky a patenty

Navštívte stránku <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Autorské práva

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Referenčné materiály

1. Chosewood LC, Wilson DE. Biosafety and microbiological and biomedical laboratories-Fifth Edition. US Department of Health and Human Services Publication, CDC. 2009;21-1112.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA; CLSI, 2014.
3. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 60th Edition. 2019.

Revízia dokumentu

Informácie o revízii dokumentu	
Doc Rev 3.0 04/2024	Boli aktualizované výstražné upozornenia. Aktualizovaná časť Ochranné známky a patenty vrátane odkazu. Aktualizované vyhlásenie kompetentného orgánu. V prípade akýchkoľvek otázok sa obráťte na miestneho zástupcu spoločnosti Roche.

Súhrn hlásení týkajúcich sa bezpečnosti a výkonu môžete nájsť pomocou odkazu: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>