



Juni 2022

QIAamp[®] DSP Virus Kit Gebrauchsanweisung (Handbuch)



Version 2



In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit dem QIAamp[®] DSP Virus Kit



60704



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND



R1 1127541DE

Inhalt

Verwendungszweck	4
Vorgesehene Anwender	4
Beschreibung und Prinzip	5
Lyse mit QIAGEN Protease (QP)	5
Adsorption an die QIAamp MinElute Membran	5
Entfernung von restlichen Kontaminanten	6
Elution von viralen Nukleinsäuren	6
Ausbeute und Qualität der viralen Nukleinsäuren	7
Zugabe interner Kontrollen	8
Zusammenfassung und Erläuterung	10
Im Lieferumfang enthaltene Materialien	11
Kit-Inhalt	11
Bestandteile des Kits	12
Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	13
Zusätzliche Reagenzien	13
Verbrauchsmaterialien	13
Ausstattung/Geräte	13
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	14
Sicherheitshinweise	14
Informationen für Notfälle	15
Vorsichtsmaßnahmen	16
Entsorgung	17

Lagerung und Handhabung der Reagenzien	18
Stabilität nach dem Öffnen	18
Entnahme, Lagerung und Handhabung von Proben.....	20
Wichtige Hinweise	22
Wichtige Hinweise vor Beginn	22
Handhabung der QIAamp MinElute Säulen.....	23
Vorbereiten der Reagenzien und Puffer	23
Einrichtung des QIAvac 24 Plus Vakuumsystems	28
Protokoll: Isolierung und Aufreinigung von viralen Nukleinsäuren aus Plasma und Serum	30
Qualitätskontrolle.....	35
Grenzen des Verfahrens	36
Leistungsmerkmale	37
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	38
Symbole	43
Anhang	46
Bestellinformationen	47
Bearbeitungshistorie des Dokuments.....	48

Verwendungszweck

Das QIAamp® DSP Virus Kit ist für die manuelle Isolierung und Aufreinigung viraler Nukleinsäuren aus menschlichen Plasma- oder Serumproben vorgesehen.

Das QIAamp DSP Virus Kit nutzt Silikamembran-Technologie (QIAamp Technologie) für die Isolierung und Aufreinigung von viralen Nukleinsäuren aus menschlichen Plasma- oder Serumproben.

Das Produkt ist für die In-vitro-Diagnostik bestimmt und ist für professionelle Anwender wie Techniker und Ärzte vorgesehen, die in molekularbiologischen Techniken geschult sind.

Vorgesehene Anwender

Das Produkt ist für professionelle Anwender wie Techniker und Ärzte vorgesehen, die in molekularbiologischen Techniken geschult sind.

Beschreibung und Prinzip

Das QIAamp DSP Virus Verfahren umfasst 4 Schritte (Lysieren, Binden, Waschen und Eluieren) und wird unter Verwendung von QIAamp MinElute® Säulen in Verbindung mit einem Vakuumverteiler und einer Standard-Mikrozentrifuge durchgeführt. Dieses Verfahren ist auf eine Minimierung des Potenzials für Kreuzkontamination von Probe zu Probe und eine sichere Handhabung von möglicherweise infektiösen Proben ausgelegt. Das einfache QIAamp DSP Virus Verfahren eignet sich für die gleichzeitige Verarbeitung mehrerer Proben. Das QIAamp DSP Virus Kit kann zur Isolierung viraler RNA und DNA von einer großen Bandbreite an RNA- bzw. DNA-Viren verwendet werden. Allerdings wurden nicht für jede Viruspezies Leistungsmerkmale ermittelt; diese sind vom Anwender zu validieren.

Lyse mit QIAGEN Protease (QP)

Die Proben werden bei denaturierenden Bedingungen und erhöhten Temperaturen lysiert. Die Lyse erfolgt in Gegenwart von QIAGEN Protease (QP) und Lysepuffer (AL), die zusammen RNasen inaktivieren.

Adsorption an die QIAamp MinElute Membran

Die Bindungsbedingungen werden durch Zugabe von Ethanol eingestellt, um eine optimale Bindung der viralen RNA und DNA an die Membran zu ermöglichen. Anschließend werden die Lysate auf eine QIAamp MinElute Säule gegeben und die viralen Nukleinsäuren werden auf der Silikagel-Membran adsorbiert, während das Lysat vom Unterdruck hindurchgesaugt wird. Salz- und pH-Bedingungen sorgen dafür, dass Proteine und andere Kontaminanten, welche die PCR sowie weitere nachgelagerte Enzymreaktionen inhibieren können, nicht auf der Membran der QIAamp MinElute Säule zurückbleiben.

Entfernung von restlichen Kontaminanten

Die Nukleinsäuren bleiben an die Membran gebunden, während Kontaminanten in 3 Waschschritten effizient gewaschen werden.

Elution von viralen Nukleinsäuren

Die hochreine virale RNA und DNA wird in einem einzigen Schritt von der Membran der QIAamp MinElute Säule in Elutionspuffer (AVE) eluiert, der auf Raumtemperatur äquilibriert wurde. QIAamp MinElute Säulen ermöglichen ein Elutionsvolumen von 20 µl oder 60 µl. Werden für nachgelagerte Anwendungen nur kleine Startvolumina benötigt (z. B. einige PCR- und RT-PCR-Assays), kann durch Elution der viralen Nukleinsäuren in 20 µl Elutionspuffer (AVE) unter Umständen die Assay-Sensitivität erhöht werden.

Für nachgelagerte Anwendungen, die ein größeres Startvolumen erfordern, kann das Elutionsvolumen auf bis zu 60 µl erhöht werden. Eine Erhöhung des Elutionsvolumens führt allerdings zur Verringerung der Nukleinsäuren-Konzentration im Eluat.

Aufgrund des verbleibenden Elutionspuffers, der nach der Zentrifugation von der Membran der Spin-Säule zurückgehalten wird, kann das Volumen des wiedergewonnenen Eluats geringer sein als das Volumen des auf die Säule aufgegebenen Elutionspuffers. Außerdem hängt das Volumen des wiedergewonnenen Eluats von der Beschaffenheit der Probe ab.

Eluierte virale Nukleinsäuren werden in Elutionsröhrchen (ET) gesammelt und können bei 2–8 °C bis zu 24 Stunden lang aufbewahrt werden. Für die Lagerung über einen längeren Zeitraum als 24 Stunden empfehlen wir, die auf gereinigten Nukleinsäuren bei –20 °C aufzubewahren.

Hinweis: Die Eluatstabilität hängt in hohem Maße von verschiedenen Faktoren ab und steht im Zusammenhang mit der jeweiligen nachgelagerten Anwendung. Sie wurde für das QIAamp DSP Virus Kit in Verbindung mit exemplarischen nachgelagerten Anwendungen evaluiert. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Gebrauchsanweisung der jeweiligen nachgelagerten Anwendung in seinem Labor zu konsultieren und/oder den gesamten Arbeitsablauf zu validieren, um geeignete Lagerungsbedingungen festzulegen.

Ausbeute und Qualität der viralen Nukleinsäuren

Die Ausbeute an aus biologischen Proben isolierter viraler Nukleinsäure liegt normalerweise bei unter 1 µg. Zur Ermittlung der Ausbeute werden quantitative Amplifikationsmethoden empfohlen. Bei der Quantifizierung von Nukleinsäuren, die mit dem QIAamp DSP Virus Protokoll isolierten wurden, ist zu beachten, dass die Probe wesentlich mehr Carrier-RNA als virale RNA enthält.

Die Carrier-RNA erfüllt zwei Aufgaben: Zum einen fördert sie die Bindung der viralen Nukleinsäuren an die QIAamp Membran, was besonders wichtig ist, wenn nur sehr wenige Zielmoleküle in der Probe vorhanden sind. Zum anderen kann durch Zugabe von großen Mengen Carrier-RNA in dem seltenen Fall, dass nicht alle RNase-Moleküle durch die chaotropen Salze und Detergenzien im Lysepuffer (AL) denaturiert wurden, die Wahrscheinlichkeit des Abbaus viraler RNA verringert werden. Ohne Zugabe von Carrier-RNA zum Lysepuffer (AL) kann die Wiederfindung von viraler RNA bzw. DNA niedriger sein.

Außerdem können einige interne Kontrollreagenzien der nachgelagerten handelsüblichen Assays Carrier-RNA enthalten. In diesen Fällen richten Sie sich bitte nach den relevanten Gebrauchshinweisen des Herstellers des nachgelagerten Assays.

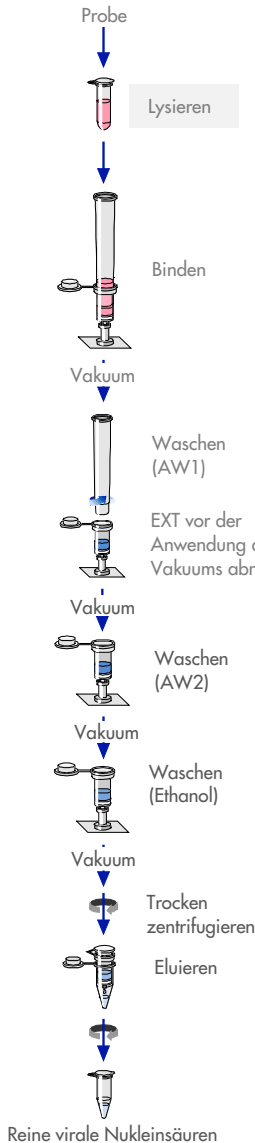
Verschiedene Amplifikationssysteme unterscheiden sich je nach Gesamtmenge der in der Reaktion vorhandenen Nukleinsäuren in ihrer Effizienz. Eluate aus diesem Kit enthalten sowohl virale Nukleinsäuren als auch Carrier-RNA, wobei wesentlich mehr Carrier-RNA vorhanden ist als virale Nukleinsäuren. Berechnungen bezüglich der Menge des Eluats, das für nachgelagerte Amplifikationen verwendet werden soll, müssen daher die Menge der zugesetzten Carrier-RNA berücksichtigen. Um in Amplifikationsreaktionen die höchstmögliche Sensitivität zu erreichen, kann es erforderlich sein, die zum Lysepuffer (AL) zugegebene Menge an Carrier-RNA anzupassen.

Zugabe interner Kontrollen

Die Anwendung des QIAamp DSP Virus Protokolls in Kombination mit handelsüblichen Amplifikationssystemen kann die Einbeziehung einer internen Kontrolle in das Aufreinigungsverfahren erfordern. Interne Kontroll-RNA oder -DNA sollte zusammen mit der Carrier-RNA dem Lysepuffer zugesetzt werden. Für eine optimale Aufreinigungseffizienz sollten interne Kontrollmoleküle länger als 200 Nukleotide sein, da für kleinere Moleküle keine zufriedenstellende Wiederfindung erreicht wird.

Ziehen Sie zur Bestimmung der optimalen Konzentration die Gebrauchsanweisung des Herstellers zurate. Die Verwendung nicht empfohlener Konzentrationen kann die Amplifikationseffizienz reduzieren.

QIAamp DSP Virus Verfahren



Lesen Sie vor Beginn des Verfahrens das Protokoll (Seite 30) aufmerksam durch.

75 µl QP, 500 µl Probe und 500 µl AL in LT geben.

15 Sekunden lang im Vortexer mischen.

15 Minuten lang bei 56 °C inkubieren.

600 µl Ethanol hinzugeben.

15 Sekunden lang im Vortexer mischen.

5 Minuten lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) inkubieren.

Lysat in die QIAamp MinElute Säule mit befestigter Säulenerweiterung (EXT) übertragen.

600 µl rekonstituierten AW1 zugeben.

EXT entfernen.

750 µl rekonstituierten AW2 zugeben.

750 µl Ethanol hinzugeben.

QIAamp MinElute Säule in WT setzen.

1 Minute lang bei 14.000 U/min zentrifugieren.

QIAamp MinElute Säule in WT setzen.

3 Minuten lang bei 56 °C inkubieren.

QIAamp MinElute Säule in ET setzen.

20 µl oder 60 µl AVE zugeben.

3 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.

1 Minute lang bei 14.000 U/min zentrifugieren.

Zusammenfassung und Erläuterung

Beim QIAamp DSP Virus Kit dient bewährte Technologie für die gleichzeitige Isolierung und Aufreinigung von viraler DNA bzw. RNA. Beim QIAamp DSP Virus Verfahren werden die selektiven Bindungseigenschaften einer silikabasierten Membran ausgenutzt, wobei die Elutionsvolumina minimal sind (20 µl oder 60 µl).

Das Verfahren eignet sich für Plasma und Serum; Proben können Citrat oder EDTA enthalten. Die Proben können frisch, lyophilisiert oder eingefroren sein, vorausgesetzt, dass sie nicht mehr als einmal eingefroren und aufgetaut werden.

Für das Vakuumverfahren werden ein Vakuumverteiler (z. B. der QIAvac 24 Plus mit dem QIAvac Connecting System) sowie eine Vakuumpumpe benötigt, die ein Vakuum von ca. 800–900 mbar erzeugen kann (z. B. die QIAGEN® Vacuum Pump). Für die einfache Überwachung des Vakuumdrucks und einen leichten Vakuumabbau sollte der Vacuum Regulator (Teil des QIAvac Connecting System) verwendet werden.


Das Verfahren dient zur Isolierung viraler RNA bzw. DNA von einer großen Bandbreite an RNA- und DNA-Viren. Das Verfahren vermeidet Kreuzkontaminationen von Probe zu Probe und gewährleistet eine sichere Handhabung von möglicherweise infektiösen Proben. Daher eignet sich das Verfahren besonders gut für die gleichzeitige Bearbeitung von mehreren Proben. Die viralen Nukleinsäuren werden in Elutionspuffer (AVE) eluiert und sind für Amplifikationsreaktionen oder die Lagerung bei –20 °C zur späteren Verwendung bereit.

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Kit-Inhalt

QIAamp DSP Virus
Katalog-Nr.
Anzahl Präparationen

60704
50

QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (WT) (QIAamp MinElute Säulen mit Waschröhrchen) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (Säulenerweiterungen) (3 ml)	COL EXT	50
ET	Elution Tubes (Elutionsröhrchen) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors	VAC CON	50
LT	Lysis Tubes (Lyseröhrchen) (2 ml)	LYS TUBE	50
WT	Wash Tubes (WT) (Waschröhrchen) (2 ml)	WASH TUBE	50
AL	Lysis Buffer* (Lysepuffer)	LYS BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1 (AW1)* (Waschpuffer 1) (Konzentrat)	WASH BUF 1 CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (AW2) [†] (Waschpuffer 2) (Konzentrat)	WASH BUF 2 CON	13 ml
AVE	Elution Buffer [†] (Elutionspuffer) (lila Deckel)	ELU BUF	4 × 2 ml
PS	Protease Solvent [†] (Proteaselösemittel)	QPROT SOLV	4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (Carrier-RNA) (rote Deckel)	CAR RNA	310
QP	QIAGEN® Protease [‡]	QPROT	1 Fläschchen
–	Gebrauchsanweisung (Handbuch)		1

* Enthält Guanidinhydrochlorid. Nicht verträglich mit bleichehaltigen Desinfektionsmitteln. Sicherheitshinweise finden Sie auf Seite 14.

[†] Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.

[‡] Das Resuspensionsvolumen beträgt 4,4 ml.

Bestandteile des Kits

Die Hauptbestandteile des Kits, die aktive Inhaltsstoffe enthalten, sind im Folgenden beschrieben.

Reagenz	Aktiver Inhaltsstoff	Konzentration (w/w) [%]
QIAGEN Protease (QP)	Subtilisin	≥ 90 bis ≤ 100
AL	Guanidinhydrochlorid	≥ 30 bis < 50
	Maleinsäure	≥ 0,1 bis < 1
AWI	Guanidinhydrochlorid	≥ 50 bis < 70

Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Zusätzliche Reagenzien

- Ethanol (96–100 %) *

Verbrauchsmaterialien

- Pipetten† und Pipettenspitzen (zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen empfehlen wir dringend Pipettenspitzen mit Aerosolbarrieren)
- Einmal-Handschuhe

Ausstattung/Geräte

- Heizblock† für die Lyse der Proben bei 56 °C für 2,0-ml-Mikroreaktionsgefäße
- Mikrozentrifuge†
- Messzylinder (50 ml)
- Vortexer
- QIAvac 24 Plus Vakuumsystem (Kat.-Nr. 19413) oder gleichwertig†

* Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, der andere Stoffe wie z. B. Methanol oder Methyläthylketon enthält.

† Stellen Sie vor dem Gebrauch sicher, dass die Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Bitte beachten Sie, dass Sie ggf. verpflichtet sind, Ihre lokalen Vorschriften zur Meldung schwerwiegender Vorkommnisse, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, an den Hersteller, seinen autorisierten Vertreter und die Regulierungsbehörde, welcher der Anwender und/oder der Patient unterliegt, zu konsultieren.

In-vitro-Diagnostikum.

Lesen Sie alle Anweisungen vor Verwendung des Kits genau durch.

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDB). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDB als praktische und kompakte PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.



VORSICHT: Es dürfen keine bleichehaltigen oder sauren Lösungen zum Probenvorbereitungsabfall zugegeben werden.

- Lysepuffer (AL) und Waschpuffer 1 (AW1) enthalten Guanidinhydrochlorid, das in Kombination mit Bleiche hochreaktive Verbindungen bilden kann. Wenn eine Flüssigkeit, die einen oder mehrere dieser Puffer enthält, verschüttet wird, reinigen Sie die betroffenen Bereiche mit einem geeigneten Labordetergens und Wasser. Enthält die verschüttete Flüssigkeit potenziell infektiöse Agenzien, reinigen Sie die Fläche zuerst mit Detergens und Wasser, danach mit 1 % (v/v) Natriumhypochlorit.

- Bei Beschädigung bzw. Auslaufen müssen die Pufferflaschen entsorgt werden; dabei müssen Sie Handschuhe und eine Schutzbrille tragen, um eine Verletzung bei Ihnen und anderen Personen zu vermeiden.
- QIAGEN hat den beim QIAamp DSP Virus Verfahren anfallenden Flüssigabfall nicht auf verbleibende infektiöse Materialien untersucht. Daher müssen bei der Arbeit mit diesem Produkt die allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit potenziell infektiösem humanem Ausgangsmaterial (Handschuhe, Laborkittel und Augenschutz) beachtet werden. Flüssigabfall muss als infektiös betrachtet und gemäß den lokalen Sicherheitsbestimmungen behandelt und entsorgt werden.
- Die Proben sind potenziell infektiös. Proben- und Assay-Abfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

Informationen für Notfälle

CHEMTREC

USA und Kanada 1-800-424-9300

Außerhalb der USA und Kanada +1 703-527-3887

Vorsichtsmaßnahmen

Für die Komponenten des QIAamp DSP Virus Kit gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Lysis Buffer (AL)



Enthält: Guanidinhydrochlorid, Maleinsäure. Warnung! Kann bei Verschlucken oder Einatmen schädlich sein. Verursacht Hautreizungen. Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Verursacht schwere Augenreizung. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen bzw. ärztliche Hilfe hinzuziehen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Inhalt/Behälter bei zugelassenem Abfallentsorgungsdienst entsorgen.

Wash Buffer 1 (AW1)



Enthält: Guanidinhydrochlorid. Warnung! Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen. Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Inhalt/Behälter bei zugelassenem Abfallentsorgungsdienst entsorgen.

QIAGEN Protease (QP)



Enthält: Subtilisin. Gefahr! Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenschäden. Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. Kann die Atemwege reizen. Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. Atemschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Bei Exposition oder falls betroffen: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.

Entsorgung

Der Abfall besteht aus Proben und Reagenzien. In diesem Abfall können toxische oder infektiöse Probenmaterialien enthalten sein, die sachgerecht entsorgt werden müssen. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die geltenden Sicherheitsbestimmungen.

Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDB). Zu jedem QIAGEN Kit und zu jeder Kit-Komponente können Sie die jeweiligen SDB im PDF-Format online unter www.qiagen.com/safety abrufen, einsehen und ausdrucken.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten aufgedruckten Verfallsdaten und Lagerungsbedingungen sind zu beachten. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

QIAamp MinElute Säulen müssen direkt nach dem Empfang bei 2–8 °C gelagert werden. Bei ordnungsgemäßer Lagerung sind die QIAamp MinElute Säulen bis zum Verfallsdatum haltbar, das auf der Kit-Verpackung angegeben ist.

Hinweis: Um sicherzustellen, dass Kit-Komponenten aus verschiedenen Kits nicht vermischt werden, beschriften Sie die QIAamp MinElute Säulen bitte mit der jeweiligen Kit-Chargennummer.

Alle Puffer können bis zu dem auf der Kit-Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei Raumtemperatur (15–25 °C) gelagert werden.

Lyophilisierte Carrier-RNA kann bis zu dem auf der Kit-Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei Raumtemperatur gelagert werden.

Lyophilisierte QIAGEN Protease (QP) kann ohne Leistungseinbußen bis zum Verfallsdatum bei Raumtemperatur gelagert werden.

Stabilität nach dem Öffnen

Carrier-RNA kann nur in Elutionspuffer (AVE) gelöst werden; die gelöste Carrier-RNA muss sofort wie auf Seite 24 beschrieben zum Lysepuffer (AL) zugegeben werden. Diese Lösung muss frisch zubereitet werden und ist bei 2–8 °C bis zu 48 Stunden lang haltbar. Nicht verwendete, in Elutionspuffer (AVE) gelöste Carrier-RNA muss bei –20 °C in Aliquoten eingefroren werden.

In Proteaselösemittel (PS) rekonstituierte QIAGEN Protease (QP) ist bei 2–8 °C bis zu 1 Jahr, jedoch maximal bis zum Verfallsdatum haltbar. Eine Aufbewahrung der QIAGEN Protease (QP) Stammlösung bei Raumtemperatur über längere Zeiträume ist zu vermeiden.

Rekonstituierter Waschpuffer 1 (AW1) und rekonstituierter Waschpuffer 2 (AW2) sind bei Raumtemperatur bis zu 1 Jahr, jedoch maximal bis zum Verfallsdatum auf der Kit-Verpackung haltbar.

Entnahme, Lagerung und Handhabung von Proben

Hinweis: Die Stabilität der Proben hängt in hohem Maße von verschiedenen Faktoren ab und ist abhängig von der jeweiligen nachgelagerten Anwendung. Sie wurde in Verbindung mit exemplarischen nachgelagerten Anwendungen evaluiert. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Gebrauchsanweisung der jeweiligen nachgelagerten Anwendung in seinem Labor zu konsultieren und/oder den gesamten Arbeitsablauf zu validieren, um geeignete Lagerungsbedingungen festzulegen.

Allgemeine Empfehlungen zu Entnahme, Transport und Lagerung finden Sie in der anerkannten CLSI-Richtlinie MM13-A „Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods“. Darüber hinaus sind die Anweisungen des Herstellers für das ausgewählte Probenentnahmesystem bei der Vorbereitung, der Lagerung, dem Transport und der allgemeinen Handhabung der Proben zu befolgen.


Das Aufreinigungsverfahren ist für die Verwendung mit menschlichen Plasma- und Serumproben optimiert. Zur Plasmagewinnung können mit EDTA oder Citrat als Antikoagulans behandelte Blutproben verwendet werden. Die Proben können frisch oder gefroren sein, vorausgesetzt, dass sie nicht mehr als einmal eingefroren und aufgetaut wurden. Tauen Sie gefrorene Proben unter leichtem Schütteln auf, sodass eine gründliche Durchmischung gewährleistet ist.

Nach der Entnahme und Zentrifugation können Plasma- und Serumproben bei 2–8 °C bis zu 6 Stunden lang aufbewahrt werden. Zur Langzeitlagerung wird empfohlen, die Proben in Aliquoten bei –80 °C bis –20 °C einzufrieren. Gefrorene Plasma- bzw. Serumproben dürfen nur einmal aufgetaut werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen führt zur Denaturierung und Ausfällung von Proteinen und zur Senkung der Virustiter, wodurch die Ausbeute an viralen Nukleinsäuren sinken kann. Darüber hinaus bilden sich bei wiederholtem Auftauen und Einfrieren Kryopräzipitate, die die Membran der QIAamp MinElute Säule verstopfen. Eventuell sichtbare Kryopräzipitate müssen bei etwa 6800 × g 3 Minuten lang abzentrifugiert werden. Der klare Überstand muss aspiriert und sofort weiterverarbeitet werden, ohne das Pellet aufzuwirbeln. Beginnen Sie sofort mit dem Aufreinigungsverfahren. Durch Zentrifugation bei niedrigen g-Kräften wird der Virustiter nicht reduziert.

Hinweis: Auf der Grundlage der Ergebnisse exemplarischer Interferenzstudien für das QIAamp DSP Virus Kit und in Übereinstimmung mit ISO 20186-2:2019(E) kann Heparin aus Blutentnahmeröhrchen die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren beeinträchtigen und eine mögliche Verschleppung in Eluate kann bei einigen nachgelagerten Anwendungen zu einer Hemmung führen. Wir empfehlen daher die Verwendung von Blutproben, die mit EDTA oder Citrat als Antikoagulans behandelt wurden.

Wichtige Hinweise

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Überprüfen Sie alle Kit-Komponenten nach der Lieferung auf Beschädigungen. Falls die Blisterverpackungen oder die Pufferflaschen beschädigt sind, verständigen Sie den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort. Für den Fall, dass Flüssigkeit ausgetreten ist oder verschüttet wurde, beachten Sie bitte den Abschnitt „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“ (Seite 14). Verwenden Sie keine beschädigten Kit-Komponenten, da dies zu einer Beeinträchtigung der Leistung des Kits führen kann.
- Verwenden Sie immer RNase-freie Geräte.
- Wechseln Sie zwischen den verschiedenen Pipettierschritten stets die Pipettenspitzen. Wir empfehlen, Pipettenspitzen mit Aerosolbarrieren zu verwenden, um Kreuzkontamination zu minimieren.
- Tragen Sie stets Einweghandschuhe, die Sie regelmäßig auf Verschmutzung mit Probenmaterial prüfen müssen.
- Falls Handschuhe kontaminiert werden und bei allen mit dem Handschuhsymbol  gekennzeichneten Schritten müssen die Handschuhe entsorgt werden.
- Um Kreuzkontamination zu minimieren, darf immer nur ein Röhrchen geöffnet werden.
- Zentrifugieren Sie die Mikrozentrifugenröhrchen nach jedem Vortexen in Impulsen kurz, um Tropfen von der Unterseite des Deckels zu entfernen.
- Alle Zentrifugationsschritte werden bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt.
- Achten Sie darauf, dass während des gesamten Vorgangs die Rückverfolgbarkeit der Proben gewährleistet ist.
- Verwenden Sie keine Kit-Komponenten von anderen Kits zusammen mit dem Kit, das Sie aktuell verwenden, es sei denn, die Chargennummern sind identisch.
- Vermeiden Sie eine Verunreinigung der Kit-Reagenzien mit Mikroorganismen.

- Wir empfehlen, die Arbeiten an einer Sicherheitswerkbank durchzuführen, bis die Proben lysiert sind, um das mit potenziell infektiösem Material verbundene Infektionsrisiko zu minimieren.
- In den Verfahrensanweisungen wird die Verarbeitung einer einzelnen Plasma- bzw. Serumprobe beschrieben. Das QIAvac 24 Plus Vakuumsystem erlaubt jedoch die gleichzeitige Verarbeitung von bis zu 24 Proben.
- Das Kit darf nur von Personen verwendet werden, die in der Laborpraxis für die In-vitro-Diagnostik geschult sind.

Handhabung der QIAamp MinElute Säulen

Wegen der Sensitivität der Nukleinsäure-Amplifikationstechniken sind bei der Handhabung der QIAamp MinElute Säulen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen nötig, um Kreuzkontaminationen zwischen den Probenvorbereitungen zu vermeiden:

- Gehen Sie beim Auftragen der Probe bzw. Lösung auf die QIAamp MinElute Säule behutsam vor. Achten Sie beim Pipettieren der Probe in die QIAamp MinElute Säule darauf, den Rand der Säule nicht zu benetzen.
- Wechseln Sie zwischen allen Pipettierschritten stets die Pipettenspitzen. Es wird die Verwendung von Pipettenspitzen mit Aerosolbarrieren empfohlen.
- Achten Sie darauf, dass Sie die QIAamp MinElute Membran nicht mit der Pipettenspitze berühren.
- Öffnen Sie stets nur eine QIAamp MinElute Säule und vermeiden Sie Aerosolbildung.

Vorbereiten der Reagenzien und Puffer

Vorbereiten der RNA

Arbeiten Sie bei den manuellen Verfahrensschritten zur Isolierung von viraler RNA zügig und lesen Sie vor Beginn den Anhang auf Seite 46.

Vorbereiten der QIAGEN Protease (QP)

Geben Sie den gesamten Inhalt des Fläschchens mit 4,4 ml Proteaselösemittel (PS) in das Fläschchen mit der lyophilisierten QIAGEN Protease (QP) und mischen Sie vorsichtig. Mischen Sie das Fläschchen durch mehrmaliges Umschwenken, um Schaumbildung zu vermeiden. Stellen Sie sicher, dass die QIAGEN Protease (QP) vollständig gelöst ist.



Die QIAGEN Protease (QP) darf nicht direkt in den Lysepuffer (AL) gegeben werden.*

Hinzufügen von Carrier-RNA und interner Kontrolle zum Lysepuffer (AL)*

Wird das QIAamp DSP Virus Kit zusammen mit diagnostischen Amplifikationssystemen verwendet, wird eine interne Kontrolle dringend empfohlen. Weiterführende Informationen finden Sie in den Gebrauchshinweisen des Herstellers. Die interne Kontrolle und die rekonstituierte Carrier-RNA sollten zu dem Lysepuffer (AL) gegeben und der Ansatz durch zehnmaliges Umschwenken vorsichtig gemischt werden. Um die Bildung von Schaum zu vermeiden, darf nicht mit dem Vortexer gemischt werden. Wenn Sie eine interne Kontrolle verwenden, reduzieren Sie das Volumen des Lysepuffers (AL) entsprechend (weitere Informationen hierzu finden Sie in Tabelle 1).

Lesen Sie in der Bedienungsanleitung des Herstellers nach, wie Sie die optimale Konzentration an interner Kontrolle bestimmen. Bei Verwendung nicht empfohlener Konzentrationen können die Ergebnisse fehlerhaft sein. Bei Berechnung der korrekten zu verwendenden Menge der internen Kontrolle müssen das Startvolumen der Probe und das Elutionsvolumen berücksichtigt werden. Es sei daran erinnert, dass das QIAamp DSP Virus Kit ein Startvolumen von 500 µl erfordert.

* Enthält chaotropes Salz. Ergreifen Sie bei der Handhabung geeignete Laborsicherheitsmaßnahmen und tragen Sie Schutzhandschuhe. Nicht verträglich mit bleichehaltigen Desinfektionsmitteln. Sicherheitshinweise finden Sie auf Seite 14.

Um eine Carrier-RNA-Lösung anzusetzen, pipettieren Sie 310 µl Elutionspuffer (AVE) in das Röhrchen, in dem sich 310 µg lyophilisierte Carrier-RNA befindet, sodass eine Lösung mit der Konzentration 1 µg/µl entsteht. Lösen Sie die Carrier-RNA sorgfältig auf, teilen Sie sie in Aliquote geeigneter Größe auf und lagern Sie diese bei –20 °C. Die Aliquote der Carrier-RNA dürfen nicht mehr als dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden.



Carrier-RNA löst sich nicht in Lysepuffer (AL). Carrier-RNA muss zuerst in Elutionspuffer (AVE) gelöst werden; erst dann kann sie zum Lysepuffer (AL) gegeben werden. Die Carrier-RNA muss immer zuerst im korrekten Volumen Elutionspuffer (AVE) vollständig gelöst werden, bevor sie mit Lysepuffer (AL) vermischt werden kann.

Berechnen Sie das für eine Probencharge benötigte Volumen der Mischung aus Lysepuffer (AL) und Carrier-RNA, indem Sie die Zahl der gleichzeitig zu bearbeitenden Proben in Tabelle 1 auswählen. Die Volumina werden mithilfe der folgenden Probengleichung berechnet:

$$n \times 0,55 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 11,2 \text{ µl/ml} = z \text{ µl}$$

Dabei ist: n = Zahl der gleichzeitig zu verarbeitenden Proben

y = berechnetes Volumen des Lysepuffers (AL)

z = Volumen der Mischung aus Carrier-RNA und Elutionspuffer (AVE), das dem Lysepuffer (AL) zugegeben werden muss

Mischen Sie vorsichtig durch zehnmalsiges Umschwenken des Röhrchens. Um die Bildung von Schaum zu vermeiden, darf nicht mit dem Vortexer gemischt werden.

Tabelle 1. Volumen von Lysepuffer (AL) und der Mischung aus Carrier-RNA und Elutionspuffer (AVE), das für das QIAamp DSP Virus Verfahren gebraucht wird*

Anz. der Proben	Vol. AL* (ml)	Vol. Carrier-RNA/AVE (µl)	Anz. der Proben	Vol. AL* (ml)	Vol. Carrier-RNA/AVE (µl)
1	0,55	6,2	13	7,15	80,0
2	1,10	12,3	14	7,70	86,0
3	1,65	18,5	15	8,25	92,4
4	2,20	24,6	16	8,80	98,6
5	2,75	30,8	17	9,35	104,7
6	3,30	37,0	18	9,90	110,9
7	3,85	43,1	19	10,45	117,0
8	4,40	49,3	20	11,00	123,2
9	4,95	55,0	21	11,55	129,4
10	5,50	61,6	22	12,10	135,5
11	6,05	67,8	23	12,65	141,7
12	6,60	73,9	24	13,20	147,8



Das Verfahren zur Probenvorbereitung ist für 5,6 µg Carrier-RNA pro Probe optimiert. Falls Ihr Amplifikationssystem erwiesenermaßen mit weniger Carrier-RNA besser funktioniert, überführen Sie nur die erforderliche Menge gelöster Carrier-RNA in die Röhren mit Lysepuffer (AL). Geben Sie für jedes Mikrogramm Carrier-RNA, das pro Präparation benötigt wird, 5 µl in Buffer AVE gelöste Carrier-RNA pro Milliliter Lysepuffer (AL) zu. Die Verwendung von weniger als 5,6 µg Carrier-RNA pro Probe ist für jeden Probentyp und jeden nachgelagerten Assay separat zu validieren.

* Wenn Sie eine interne Kontrolle verwenden, reduzieren Sie das Volumen des Lysepuffers (AL) entsprechend.

Vorbereiten von Waschpuffer 1 (AW1)*

Messen Sie mit einem Messzylinder 25 ml Ethanol (96–100 %) ab und geben Sie das Ethanol in die Flasche mit 19 ml des Konzentrats von Waschpuffer 1 (AW1). Haken Sie das Kontrollkästchen auf dem Etikett ab, damit ersichtlich ist, dass Ethanol zugegeben wurde. Bewahren Sie den rekonstituierten Waschpuffer 1 (AW1) bei Raumtemperatur (15–25 °C) auf.



Mischen Sie vor Beginn des Verfahrens stets den rekonstituierten Waschpuffer 1 (AW1), indem Sie die Flasche mehrmals umschwenken.

Vorbereiten von Waschpuffer 2 (AW2)†

Messen Sie mit einem Messzylinder 30 ml Ethanol (96–100 %) ab und geben Sie das Ethanol in die Flasche mit 13 ml des Konzentrats von Waschpuffer 2 (AW2). Haken Sie das Kontrollkästchen auf dem Etikett ab, damit ersichtlich ist, dass Ethanol zugegeben wurde. Bewahren Sie den rekonstituierten Waschpuffer 2 (AW2) bei Raumtemperatur (15–25 °C) auf.



Mischen Sie vor Beginn des Verfahrens stets den rekonstituierten Waschpuffer 2 (AW2), indem Sie die Flasche mehrmals umschwenken.

Vorbereiten des Elutionspuffers (AVE)

Im Lieferumfang des Kits befinden sich 4 Röhrchen Elutionspuffer (AVE). Eine Kontamination des Puffers mit RNasen ist zu vermeiden. Wenn Sie höchstens 4 Aufreinigungen mit einem einzigen Kit durchführen, wird empfohlen, das Röhrchen Elutionspuffer (AVE) nach jedem Verfahren zu entsorgen.

* Enthält chaotropes Salz. Ergreifen Sie bei der Handhabung geeignete Laborsicherheitsmaßnahmen und tragen Sie Schutzhandschuhe. Nicht verträglich mit bleichehaltigen Desinfektionsmitteln. Sicherheitshinweise finden Sie auf Seite 14.

† Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.

Einrichtung des QIAvac 24 Plus Vakuumsystems

Stellen Sie sicher, dass die Säulenerweiterung (EXT), die QIAamp MinElute Säule, der VacConnector (VC) und das VacValve korrekt installiert sind (siehe Abbildung 1).

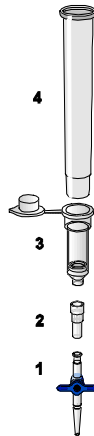


Abbildung 1. Zusammenbau der Komponenten des QIAamp DSP Virus Kit für die Vakuumverarbeitung von Proben

1. VacValve (im Lieferumfang des Vakuumsystems enthalten)

3. QIAamp MinElute Säule

2. VacConnector (VC)

4. Säulenerweiterung (EXT)

Wir empfehlen eine Kennzeichnung der Lyseröhrchen (LT), Elutionsöhrchen (ET) und der QIAamp MinElute Säulen zur Verwendung in Verbindung mit dem QIAvac 24 Plus Vakuumsystem gemäß dem Schema in Abbildung 2, um eine Verwechslung von Proben zu verhindern. Diese Abbildung kann kopiert und mit den Namen der Proben beschriftet werden.

Datum: _____

Bediener: _____

Lauf-ID: _____

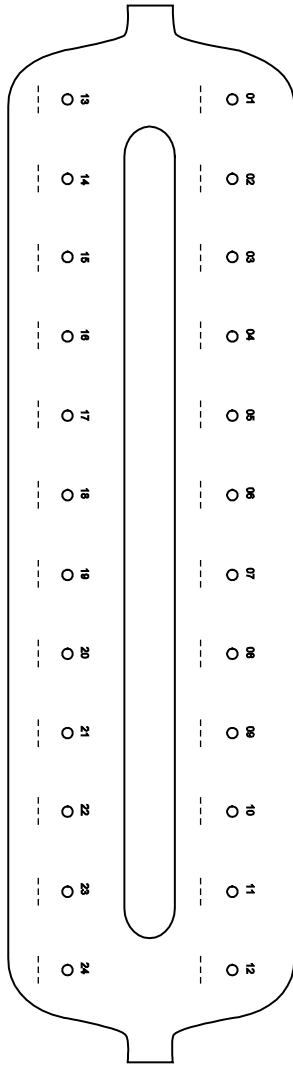


Abbildung 2. Kennzeichnungsschema für Lyseröhrchen (LT), Elutionsröhrchen (ET) und QIAamp MinElute Säulen zur Verwendung auf dem QIAvac 24 Plus Vakuumsystem

Protokoll: Isolierung und Aufreinigung von viralen Nukleinsäuren aus Plasma und Serum

Für die Isolierung und Aufreinigung von viralen Nukleinsäuren aus 500 µl EDTA- oder Citrat-Plasma bzw. -Serum.

Vorbereitende Schritte

- Lassen Sie die Proben auf Raumtemperatur äquilibrieren (15–25 °C) und stellen Sie sicher, dass sie gut gemischt sind.
- Stellen Sie sicher, dass alle Reagenzien und die QIAamp MinElute Säulen (in verschlossenen Blistern) auf Raumtemperatur äquilibriert sind.
- Stellen Sie einen Heizblock für die Verwendung in den Schritten 4 und 17 auf 56 °C ein.
- Stellen Sie sicher, dass Waschpuffer 1 (AW1), Waschpuffer 2 (AW2) und QIAGEN Protease (QP) gemäß den Anweisungen unter „Wichtige Hinweise vor Beginn“ auf Seite 22 vorbereitet wurden.
- Wenn sich im Lysepuffer (AL) Niederschlag gebildet hat, lösen Sie diesen durch Inkubation bei 56 °C auf.
- Geben Sie gemäß den Anweisungen auf Seite 24 in Elutionspuffer (AVE) rekonstituierte Carrier-RNA oder interne Kontrolle zum Lysepuffer (AL) zu.
- Verwenden Sie möglichst frischen Elutionspuffer (AVE) für jedes Verfahren (4 Rörchen sind im Lieferumfang enthalten).
- Stecken Sie einen VacConnector (VC) in jeden Luer-Adapter des Vakuumsystems, um Kreuzkontamination zu minimieren.
- Bei QIAGEN wird jede einzelne Kit-Charge im Rahmen der Qualitätskontrolle zur Freigabe einem Funktionstest unterzogen. Mischen Sie daher keine Reagenzien aus verschiedenen Kit-Chargen und kombinieren Sie keine einzelnen Reagenzien aus verschiedenen Reagenzienchargen.

- Stellen Sie sicher, dass die Abfallflasche des Vakuumsystems leer ist und alle Verbindungsstücke korrekt verbunden sind.
- Einzelheiten zur Bedienung und insbesondere zur Wartung des Vakuumsystems finden Sie im beiliegenden Handbuch.

Verfahren

1. Pipettieren Sie 75 µl QIAGEN Protease (QP) in ein Lyseröhrchen (LT).



Überprüfen Sie vor dem Gebrauch das Verfallsdatum der rekonstituierten Protease.

2. Geben Sie 500 µl Plasma- bzw. Serumprobe in das Lyseröhrchen (LT).
3. Geben Sie 500 µl Lysepuffer (AL) (mit 11,2 µg/ml Carrier-RNA) in das Lyseröhrchen (LT), schließen Sie den Deckel und mischen Sie den Inhalt des Röhrchens ≥ 15 Sekunden lang durch Vortexten in Impulsen.

Zur Gewährleistung einer effizienten Lyse müssen Probe und Lysepuffer (AL) gründlich vermischt werden, sodass eine homogene Lösung entsteht.



Lysepuffer (AL) enthält interne Kontrolle. Da der Lysepuffer (AL) eine hohe Viskosität aufweist, achten Sie darauf, dass das korrekte Volumen von Lysepuffer (AL) zugegeben wird, indem Sie genau pipettieren.



Die QIAGEN Protease (QP) darf nicht direkt in den Lysepuffer (AL) gegeben werden.

4. Inkubieren Sie 15 Minuten lang bei 56 °C.
5. Zentrifugieren Sie das Lyseröhrchen (LT) ≥ 5 Sekunden lang bei voller Drehzahl, um Tropfen von der Unterseite des Deckels zu entfernen.



6. Wechseln Sie die Handschuhe und öffnen Sie das Lyseröhrchen (LT) vorsichtig.

7. Geben Sie 600 µl Ethanol (96–100 %) in das Lyseröhrchen (LT) und schließen Sie dann den Deckel des Röhrchens. Mischen Sie dann ≥ 15 Sekunden lang gründlich durch Vortexen in Impulsen. Inkubieren Sie 5 Minuten lang bei Raumtemperatur (15–25 °C).
8. Zentrifugieren Sie das Lyseröhrchen (LT) ≥ 5 Sekunden lang bei voller Drehzahl, um Tropfen von der Unterseite des Deckels zu entfernen.
9. Stecken Sie die QIAamp MinElute Säule auf den VacConnector (VC) des Vakuumsystems (siehe Abbildung 1, Seite 28). Stecken Sie eine Säulenerweiterung (EXT) in die offene QIAamp MinElute Säule.



Bewahren Sie das Waschröhrchen (WT) für die Trocken-zentrifugation in Schritt 16 auf.



10. Wechseln Sie die Handschuhe und öffnen Sie immer nur ein Röhrchen gleichzeitig.
11. Geben Sie das gesamte Lysat aus Schritt 7 vorsichtig in die Säulenerweiterung (EXT) der QIAamp MinElute Säule, ohne dabei den Rand zu benetzen.
12. Schalten Sie die Vakuumpumpe ein. Nachdem das Lysat durch die QIAamp MinElute Säule gesaugt wurde, öffnen Sie das Ventil des Vakuumsystems, um den Unterdruck abzubauen.

Wenn Sie mehrere QIAamp MinElute Säulen gleichzeitig verarbeiten, empfehlen wir, nach dem Passieren des Lysats das VacValve jeder Säule zu schließen, um die Dauer dieses Schrittes bei Unterdruck zu reduzieren.



Wenn das Lysat die Membran auch nach 15 Minuten noch nicht vollständig passiert hat, entsorgen Sie die QIAamp MinElute Säule und wiederholen Sie das Verfahren mit einer neuen Probe.



Das Ventil des Vakuumsystems dient zum schnellen Abbau des Unterdrucks.

13. Geben Sie 600 µl Waschpuffer 1 (AW1) auf die QIAamp MinElute Säule. Entfernen und entsorgen Sie die Säulenerweiterung (EXT) vorsichtig und schließen Sie das Ventil des Vakuumsystems. Nachdem Waschpuffer 1 (AW1) durch die QIAamp MinElute Säule gesaugt wurde, öffnen Sie das Ventil, um den Unterdruck abzubauen.



Die Säulenerweiterungen (EXT) dürfen beim Entfernen nicht über benachbarte QIAamp MinElute Säulen geführt werden, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

14. Geben Sie 750 µl Waschpuffer 2 (AW2) auf die QIAamp MinElute Säule, ohne den Rand zu benetzen. Während der Deckel der Säule offen bleibt, schließen Sie das Ventil des Vakuumsystems. Nachdem Waschpuffer 2 (AW2) durch die QIAamp MinElute Säule gesaugt wurde, öffnen Sie das Ventil, um den Unterdruck abzubauen.
15. Geben Sie 750 µl Ethanol (96–100 %) auf die QIAamp MinElute Säule, ohne den Rand zu benetzen. Während der Deckel der Säule offen bleibt, schließen Sie das Ventil des Vakuumsystems. Nachdem das Ethanol durch die QIAamp MinElute Säule gesaugt wurde, öffnen Sie das Ventil, um den Unterdruck abzubauen.




Geben Sie das Ethanol mit Pipettenspitzen mit Aerosolbarrieren auf die QIAamp MinElute Säule.


16. Schließen Sie den Deckel der QIAamp MinElute Säule, nehmen Sie sie aus dem Vakuumsystem und entsorgen Sie den VacConnector (VC). Setzen Sie die QIAamp MinElute Säule in das Waschröhrchen (WT) aus Schritt 9 und zentrifugieren Sie bei voller Drehzahl (ungefähr $20.000 \times g$ bzw. 14.000 U/min) 1 Minute lang, um die Membran vollständig zu trocknen. Entsorgen Sie das Waschröhrchen (WT) mit dem Filtrat.




Wird die Trockenzentrifugation übersprungen, kann es zu einer Hemmung im nachgelagerten Assay kommen.

17. Setzen Sie die QIAamp MinElute Säule in ein neues Waschröhrchen (WT) und inkubieren Sie bei offenem Deckel und 56 °C 3 Minuten lang, um Restflüssigkeit zu verdampfen.
18. Stellen Sie die QIAamp MinElute Säule in ein neues Elutionsröhrchen (ET) und werfen Sie das Waschröhrchen (WT). Öffnen Sie vorsichtig den Deckel der QIAamp MinElute Säule und geben Sie 20 µl oder 60 µl Elutionspuffer (AVE) (je nach dem nachgelagerten Assay) in die Mitte der Membran.


 Es muss unbedingt ein neues Elutionsröhrchen verwendet werden, um eine Kontamination mit Resten des Waschpuffers zu vermeiden, die zu einer Hemmung des nachgelagerten Assays führen könnte.


 Das Dispensieren des Elutionspuffers in die Mitte der Membran ist besonders wichtig für kleinere Elutionsvolumina, um eine optimale Wiederfindung der Nukleinsäuren und des Elutionspuffers zu gewährleisten.

 Das Elutionsvolumen kann an die Anforderungen der nachgelagerten Anwendung angepasst werden. Denken Sie daran, dass das Volumen des wiedergewonnenen Eluats geringer sein kann als das Volumen des auf die Säule aufgegebenen Elutionspuffers, da Elutionspuffer nach der Zentrifugation von der Membran der Spin-Säule zurückgehalten werden kann.

 Stellen Sie sicher, dass der Elutionspuffer auf Raumtemperatur äquilibriert wurde.

19. Schließen Sie den Deckel und inkubieren Sie ≥ 3 Minuten lang bei Raumtemperatur (15–25 °C). Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei voller Drehzahl (ungefähr $20.000 \times g$ oder 14.000 U/min), um die viralen Nukleinsäuren zu eluieren.

 Richten Sie die Deckel der Elutionsröhrchen so aus, dass sie gegen die Drehrichtung des Rotors zeigen (wenn sich der Rotor also im Uhrzeigersinn dreht, müssen die Deckel gegen den Uhrzeigersinn zeigen und umgekehrt).

 Führen Sie nach Abschluss dieses Protokolls die für das Vakuumsystem vorgesehenen Wartungsmaßnahmen durch (weiterführende Hinweise finden Sie im Handbuch des Vakuumsystems).

Qualitätskontrolle

Gemäß dem zertifizierten Gesamtqualitätsmanagementsystem von QIAGEN wird jede Charge des QIAamp DSP Virus Kit nach festgelegten Prüfkriterien getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

Grenzen des Verfahrens

Die Systemleistung wurde im Rahmen von Studien zur Leistungsevaluierung getestet, bei denen virale Nukleinsäuren aus menschlichen Plasma- und Serumproben aufgereinigt wurden.

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, für jedes Verfahren, das im Labor des Anwenders durchgeführt wird und das nicht durch die Leistungsstudien von QIAGEN abgedeckt ist, die Systemleistung selbst zu verifizieren.

Um das Risiko einer negativen Auswirkung auf die Ergebnisse der diagnostischen Tests zu minimieren, sollten für nachgelagerte Anwendungen geeignete Kontrollen mitgeführt werden. Die erhaltenen diagnostischen Ergebnisse müssen unter Berücksichtigung anderer vorliegender klinischer und labortechnischer Daten interpretiert werden.

Leistungsmerkmale

Die zutreffenden Leistungsmerkmale sind auf der Registerkarte „Resources“ (Ressourcen) der Produktseite auf www.qiagen.com verfügbar.

Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auch auf der Seite „Frequently Asked Questions“ (Häufig gestellte Fragen, FAQ) unseres technischen Support-Centers unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Darüber hinaus stehen Ihnen die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler beim Technischen Service von QIAGEN stets unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zu den Informationen und/oder Protokollen in diesem Handbuch oder den für die Proben und Assays verwendeten Methoden haben sollten (Kontaktinformationen finden Sie auf www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

Allgemeine Handhabung

- a) Verstopfung der Pipettenspitzen beim Probentransfer
- Die gefrorenen Proben wurden nach dem Auftauen nicht gründlich gemischt. Tauen Sie gefrorene Proben unter leichtem Schütteln auf, sodass eine gründliche Durchmischung gewährleistet ist.
- Kryopräzipitate, die sich beim Einfrieren und Auftauen bilden, verstopfen die QIAamp MinElute Membran. Falls Kryopräzipitate sichtbar sind, entfernen Sie diese durch 5-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g von der Probe.
- b) QIAamp MinElute Säule verstopft
- Bei reduzierter Flussrate kann sich die Vakuumbehandlung verlängern.
- Alternativ können Sie das VacValve schließen (falls verwendet) und vorsichtig die Einheit aus Säulenerweiterung, VacConnector und VacValve von der QIAamp MinElute Säule entfernen. Achten Sie darauf, dass kein Lysat in der Säulenerweiterung verloren geht.
- Nehmen Sie die QIAamp MinElute Säule vom Vakuumverteiler, setzen Sie sie in ein 2-ml-Waschröhrchen (WT) und zentrifugieren Sie sie bei voller Drehzahl, bis die Probe die Membran vollständig passiert hat. Setzen Sie die Einheit aus Säulenerweiterung, VacConnector und VacValve mit dem verbliebenen Lysat wieder auf die Säule. Schalten Sie die Vakuumpumpe ein, öffnen Sie das VacValve und laden Sie das restliche Lysat.

Kommentare und Vorschläge

Wiederholen Sie diesen Vorgang, wenn die QIAamp MinElute Säule weiterhin verstopft ist.

Kryopräzipitate, die sich beim Einfrieren und Auftauen bilden, verstopfen die Membran der QIAamp MinElute Säule. Falls Kryopräzipitate sichtbar sind, entfernen Sie diese durch 5-minütige Zentrifugation bei $16.000 \times g$ von der Probe.

Die Verwendung von eisgekühltem Ethanol während der Lyse kann dazu beitragen, das Risiko einer Membranverstopfung zu verringern. Außerdem ist es von entscheidender Bedeutung, dass Sie die Puffer für die Lyse in der oben beschriebenen korrekten Reihenfolge hinzufügen. Die QIAGEN Protease (QP) darf nicht direkt in den Lysepuffer (AL) gegeben werden.

- c) Im Lysepuffer hat sich Niederschlag gebildet

Lösen Sie diesen durch Inkubation des Lysepuffers (AL) bei 56°C auf.

- d) Variable Elutionsvolumina

Wie viel Eluat gewonnen wird, hängt von der Art der Probe ab.

Aufgrund des verbleibenden Elutionspuffers, der nach der Zentrifugation von der Membran der Spin-Säule zurückgehalten wird, kann das Volumen des wiedergewonnenen Eluats geringer sein als das Volumen des auf die Säule aufgegebenen Elutionspuffers.

Geben Sie den Elutionspuffer in die Mitte der Membran. Das Dispensieren des Elutionspuffers in die Mitte der Membran ist besonders wichtig für kleinere Elutionsvolumina, um eine optimale Wiederfindung der Nukleinsäuren und des Elutionspuffers zu gewährleisten.

- e) Vakuumdruck von ~ 800 bis ~ 900 mbar wird nicht erreicht

Der Vakuumverteiler ist nicht fest verschlossen. Drücken Sie nach Einschalten des Vakuums auf den Deckel des Vakuumverteilers. Überprüfen Sie, ob der Vakuumdruck erreicht wird. Dichtung des QIAvac Deckels hat sich abgenutzt. Überprüfen Sie visuell die Dichtung des Vakuumverteilers und ersetzen Sie sie bei Bedarf.

VacValves haben sich abgenutzt. Entfernen Sie alle VacValves und setzen Sie die VacConnectors direkt in die Luer-Aufnahmen. Setzen Sie die QIAamp MinElute Säulen in die VacConnectors, schließen Sie die Deckel der Säulen und legen Sie Unterdruck

Kommentare und Vorschläge

an. Überprüfen Sie, ob der Vakuumdruck erreicht wird. Ersetzen Sie die VacValves, falls erforderlich.

Verbindung mit der Vakuumpumpe ist undicht. Schließen Sie alle Luer-Aufnahmen mit Luer-Kappen und schalten Sie die Vakuumpumpe ein. Überprüfen Sie, ob der Vakuumdruck nach Einschalten der Pumpe (und bei geschlossenem Vacuum Regulator-Ventil) stabil bleibt. Tauschen Sie bei Bedarf die Verbindungen zwischen Pumpe und Vakuumverteiler aus.

Wenn der Vakuumdruck noch immer nicht erreicht wird, ersetzen Sie die Vakuumpumpe durch eine leistungsstärkere.

DNA liefert in nachgelagerten Reaktionen keine guten Ergebnisse

- a) Unvollständige Lyse der Proben
- Wenn QIAGEN Protease (QP) über einen längeren Zeitraum erhöhten Temperaturen ausgesetzt wird, kann sie ihre Aktivität verlieren. Wiederholen Sie das Verfahren mit neuen Proben und frischer QIAGEN Protease (QP).

Achten Sie darauf, dass die QIAGEN Protease (QP) mit Proteaselösemittel gemäß den obigen Anweisungen aufgelöst wird. Mischen Sie das Fläschchen durch mehrmaliges Umschwenken, um Schaumbildung zu vermeiden. Stellen Sie sicher, dass die QIAGEN Protease (QP) vollständig gelöst ist. Die QIAGEN Protease (QP) darf nicht direkt in den Lysepuffer (AL) gegeben werden.

Zur Gewährleistung einer effizienten Lyse müssen Probe und Lysepuffer (AL) gründlich vermischt werden, sodass eine homogene Lösung entsteht. Da der Lysepuffer (AL) eine hohe Viskosität aufweist, achten Sie darauf, dass das korrekte Volumen von Lysepuffer (AL) zugegeben wird. Pipettieren Sie dafür langsam und verwenden Sie eine geeignete Pipette.

- b) Verwendung von niedrigprozentigem Ethanol statt 96–100 %
- Wiederholen Sie die Nukleinsäure-Aufreinigung mit neuen Proben und 96–100 % Ethanol. Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, der andere Stoffe wie z. B. Methanol oder Methylethylketon enthält.

Kommentare und Vorschläge















- c) Waschpuffer 1 (AW1) oder Waschpuffer 2 (AW2) falsch vorbereitet
- Achten Sie darauf, dass die Konzentrate von Waschpuffer 1 (AW1) und Waschpuffer 2 (AW2) mit dem richtigen Volumen von 96–100 % Ethanol verdünnt und durch mehrmaliges Umschwenken der Flasche gemischt wurden, bevor Sie das Verfahren starten.
- d) Plasma- und Serumproben wurden nicht richtig vorbereitet, gelagert oder gemischt
- Das Aufreinigungsverfahren ist für die Verwendung mit menschlichen Plasma- und Serumproben optimiert. Zur Plasmagewinnung können mit EDTA oder Citrat als Antikoagulans behandelte Blutproben verwendet werden. Nach der Entnahme und Zentrifugation können Plasma- und Serumproben bei 2–8 °C bis zu 6 Stunden lang aufbewahrt werden. Zur Langzeitlagerung wird empfohlen, die Proben in Aliquoten bei –80 °C bis –20 °C einzufrieren.
- Gefrorene Plasma- bzw. Serumproben dürfen nur einmal aufgetaut werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen führt zur Denaturierung und Ausfällung von Proteinen und zur Senkung der Virustiter, wodurch die Ausbeute an viralen Nukleinsäuren sinken kann.
- Tauen Sie gefrorene Proben unter leichtem Schütteln auf, sodass eine gründliche Durchmischung gewährleistet ist.
- e) Wenig bis keine DNA im Eluat
- Verringern Sie das Elutionsvolumen oder erhöhen Sie die Menge des zur Reaktion zugegebenen Eluats, falls möglich.
- f) Ungeeignetes Elutionsvolumen gewählt
- Ermitteln Sie das für Ihre nachgelagerte Anwendung geeignete Maximalvolumen an Eluat. Reduzieren oder erhöhen Sie das in der nachgelagerten Anwendung eingesetzte Eluatvolumen entsprechend. Das Elutionsvolumen kann proportional angepasst werden. Die Elution mit kleineren Volumina an Buffer AVE führt zu höheren Nukleinsäurekonzentrationen.











Kommentare und Vorschläge

- g) Verschleppung eines potenziellen Hemmstoffs
- Achten Sie darauf, dass Sie vor der Elution einen Trockenzentrifugationsschritt durchführen, um eine mögliche Hemmung des nachgelagerten Assays zu vermeiden.
- Es muss unbedingt ein neues Elutionsröhrchen verwendet werden, um eine Kontamination mit Resten des Waschpuffers zu vermeiden, die zu einer Hemmung des nachgelagerten Assays führen könnte.
- Auf der Grundlage der Ergebnisse exemplarischer Interferenzstudien für das QIAamp DSP Virus Kit und in Übereinstimmung mit ISO 20186-2:2019(E) kann Heparin aus Blutentnahmeröhrchen die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren beeinträchtigen und eine mögliche Verschleppung in Eluate kann bei einigen nachgelagerten Anwendungen zu einer Hemmung führen. Wir empfehlen daher die Verwendung von Blutproben, die mit EDTA oder Citrat als Antikoagulans behandelt wurden.
- h) Carrier-RNA zersetzt/falsch vorbereitet
- Die Carrier-RNA erfüllt zwei Aufgaben: Zum einen fördert sie die Bindung der viralen Nukleinsäuren an die QIAamp Membran, was besonders wichtig ist, wenn nur sehr wenige Zielmoleküle in der Probe vorhanden sind. Zum anderen kann durch Zugabe von großen Mengen Carrier-RNA in dem seltenen Fall, dass nicht alle RNase-Moleküle durch die chaotropen Salze und Detergenzien im Lysepuffer (AL) denaturiert wurden, die Wahrscheinlichkeit des Abbaus viraler RNA verringert werden.
- Ohne Zugabe von Carrier-RNA zum Lysepuffer (AL) kann die Wiederfindung von viraler RNA bzw. DNA niedriger sein.
- Carrier-RNA kann nur in Buffer AVE gelöst werden; die gelöste Carrier-RNA muss sofort zum Lysepuffer (AL) zugegeben werden.
- Außerdem können einige interne Kontrollreagenzien der nachgelagerten handelsüblichen Assays Carrier-RNA enthalten. In diesen Fällen richten Sie sich bitte nach den relevanten Gebrauchshinweisen des Herstellers des nachgelagerten Assays.

Symbole

Die folgenden Symbole werden in der Gebrauchsanweisung oder auf der Verpackung und Kennzeichnung verwendet:

Symbol	Bedeutung des Symbols
 Σ <N>	Reagenzien ausreichend für <N> Reaktionen
	Verwendbar bis
	Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der europäischen Verordnung 2017/746 über In-vitro-Diagnostika.
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargenbezeichnung
	Materialnummer (Kennzeichnung von Komponenten)
	Komponenten
	Volumen
	Enthält
	Anzahl
	Internationale Artikelnummer
	R steht für Revision der Gebrauchsanweisung, n ist die Revisionsnummer
	Temperaturbegrenzung

Symbol	Bedeutung des Symbols
	Hersteller
	Gebrauchsanweisung beachten
	Vor Sonnenlicht schützen
	Warnung/Vorsicht
	Nach Lieferung
	Wichtiger Hinweis
	Nach einem Protokollschritt mit dieser Kennzeichnung die Handschuhe wechseln
	Bei Lieferung öffnen; QIAamp MinElute Säulen bei 2–8 °C lagern
	Nach Zugabe von Ethanol in die Flasche das aktuelle Datum notieren
	Hinzugeben

Symbol	Bedeutung des Symbols
--------	-----------------------

LYOPH

Lyophilisiert

RCNS

Rekonstituieren in

EtOH

Ethanol

GuHCl

Guanidinhydrochlorid

MALEIC ACID

Maleinsäure

SUBT

Subtilisin



Führt zu

UDI

Eindeutige Produktidentifizierung

Anhang

Handhabung von RNA

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme, die üblicherweise keine Cofaktoren für ihre Funktion benötigen. Da RNasen nur schwer zu inaktivieren sind und schon geringe Mengen ausreichen, um RNA zu degradieren, dürfen Kunststoff- oder Glas-Laborartikel nur dann verwendet werden, wenn mögliche RNase-Kontaminationen beseitigt wurden. Es ist darauf zu achten, dass während des Isolierungsverfahrens und im Anschluss daran nicht unbeabsichtigt RNase in die RNA-Probe eingeschleppt wird. Um ein RNase-freies Umfeld zu schaffen und zu erhalten, müssen beim Arbeiten mit RNA bei der Vorbehandlung und Verwendung von Einweg- und Mehrwegbehältnissen sowie Lösungen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden.

Allgemeine Handhabung

Beim Arbeiten mit RNA sollte immer eine angemessene mikrobiologische aseptische Arbeitsweise angewendet werden. An Händen und Staubpartikeln können Bakterien und Schimmelpilze haften; sie sind die häufigste Quelle von RNase-Kontaminationen. Tragen Sie daher immer Latex- oder Vinylhandschuhe, wenn Sie mit Reagenzien oder RNA-Proben arbeiten, um eine RNase-Kontamination über die Hautoberfläche oder durch staubige Laborgeräte zu vermeiden. Wechseln Sie die Einmal-Handschuhe häufig und halten Sie Röhren verschlossen.

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
QIAamp DSP Virus Kit (50)	Für 50 Präparationen: QIAamp MinElute Säulen, Puffer, Reagenzien, Röhrchen, Säulenerweiterungen, VacConnectors	60704
Zubehör		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold	Vakuumverteiler zur Verarbeitung von 1–24 Spin-Säulen: QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold, Luer-Stopfen und Schnellkupplungen	19413
Vacuum Pump	Universal-Vakuumpumpe	84020
VacConnectors	500 Einweg-Verbindungsstücke zur Verwendung mit QIAamp Spin-Säulen auf Luer-Ansätzen	19407
VacValves	24 Ventil zur Verwendung mit QIAvac 24 und QIAvac 24 Plus	19408
Vacuum Regulator	Vakuumregler	19530
QIAvac Connecting System	System zur Verbindung von Vakuumverteiler und Vakuumpumpe: enthält Ablage, Abfallflaschen, Schläuche, Verbindungsstücke, Ventil, Messgerät und 24 VacValves	19419

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie in der Gebrauchsanweisung für das jeweilige QIAGEN Kit. Gebrauchsanweisungen für QIAGEN Kits sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Bearbeitungshistorie des Dokuments

Revision	Beschreibung
R1, Juni 2022	<p>Version 2, Revision 1</p> <ul style="list-style-type: none">● Auf Kit-Version 2 zur Einhaltung der IVD-Verordnung aktualisiert● Abschnitte „Verwendungszweck“ und „Grenzen des Verfahrens“ aktualisiert● „Beschreibung und Prinzip“ aktualisiert● „Im Lieferumfang enthaltene Materialien“ (aktive Inhaltsstoffe hinzugefügt) und „Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien“ aktualisiert● „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“ aktualisiert (Abschnitte „Informationen für Notfälle“ und „Entsorgung“ hinzugefügt)● „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ aktualisiert● „Entnahme, Lagerung und Handhabung von Proben“ aktualisiert● „Wichtige Hinweise“ und „Verfahren“ aktualisiert● „Leistungsmerkmale“ aktualisiert● „Anhang“ ergänzt● „Hilfe zur Fehlerbehebung“ hinzugefügt● Abschnitt „Symbole“ aktualisiert● „Bestellinformationen“ ergänzt

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für das QIAamp® DSP Virus Kit

Mit der Verwendung dieses Produkts erkennen jegliche Käufer oder Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und dieser Gebrauchsanweisung bereitgestellten Protokollen und nur mit den im Panel enthaltenen Komponenten verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keine Lizenz zur Verwendung oder Kombination der Komponenten dieses Panels mit anderen Komponenten, die nicht in diesem Panel enthalten sind, mit Ausnahme der Anwendungen, die in den mit dem Produkt bereitgestellten Protokollen, dieser Gebrauchsanweisung sowie zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschrieben werden. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN Anwendern für andere QIAGEN Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Panel und/oder die mit diesem Panel durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Panel und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Panels stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Panel und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Lizenzbedingungen finden Sie unter www.qiagen.com.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Gruppe). Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

1127541DE 06/2022 HB-3032-001 © 2022 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Bestellungen www.qiagen.com/shop | Technischer Support support.qiagen.com | Website
www.qiagen.com