



Lipanj 2022.

# Upute za uporabu za komplet QIAamp<sup>®</sup> DSP Virus Spin Kit (Priručnik)



Inačica 2



Za in vitro dijagnostičku uporabu

Za uporabu s kompletom QIAamp<sup>®</sup> DSP Virus Spin Kit



61704



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Njemačka



1127542HR

# Sadržaj

Predviđena uporaba .....	4
Predviđeni korisnik .....	4
Opis i načelo.....	5
Liza s pomoću enzima QIAGEN Protease (QP).....	5
Adsorpcija u membranu QIAamp MinElute .....	5
Uklanjanje preostalih kontaminanata .....	6
Elucija nukleinskih kiselina virusa .....	6
Prinos i kvaliteta nukleinskih kiselina virusa .....	7
Dodavanje internih kontrola.....	8
Automatizirano pročišćavanje nukleinske kiseline virusa na instrumentu QIAcube Connect MDx .....	8
Sažetak i objašnjenje .....	11
Uključeni materijali .....	12
Sadržaj kompleta .....	12
Komponente kompleta .....	13
Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni.....	14
Dodatni reagensi .....	14
Potrošni materijali.....	14
Oprema .....	14
Samo za automatizirani postupak .....	14
Upozorenja i mjere opreza .....	16
Sigurnosne informacije.....	16

Informacije za hitne slučajeve .....	17
Mjere opreza .....	18
Odlaganje u otpad .....	19
Pohrana i rukovanje reagensima .....	20
Stabilnost tijekom uporabe .....	20
Prikupljanje, pohrana i rukovanje ispitcima .....	22
Važne napomene .....	24
Važne točke prije započinjanja .....	24
Rukovanje kolonama QIAamp MinElute .....	25
Centrifugiranje .....	25
Obrada kolona QIAamp MinElute u mikrocentrifugi .....	25
Priprema reagensa i pufera .....	26
Protokol: pročišćavanje nukleinskih kiselina virusa iz plazme ili seruma primjenom mikrocentrifuge ili instrumenta QIAcube Connect MDx .....	31
Kontrola kvalitete .....	36
Ograničenja .....	37
Radne značajke .....	38
Vodič za rješavanje problema .....	39
Simboli .....	43
Prilog .....	46
Informacije za naručivanje .....	47
Povijest revizija dokumenta .....	49

## Predviđena uporaba

Komplet QIAamp® DSP Virus Spin Kit namijenjen je za ručnu, ili, ako se upotrebljava zajedno s instrumentom QIAcube® Connect MDx, za automatiziranu izolaciju i pročišćavanje nukleinskih kiselina virusa iz uzoraka humane plazme i seruma.

Komplet QIAamp DSP Virus Spin Kit primjenjuje tehnologiju membrane od silika-gela (tehnologija QIAamp) za izolaciju i pročišćavanje nukleinskih kiselina virusa iz uzoraka humane plazme i seruma.

Ovaj proizvod namijenjen je za in vitro dijagnostičku uporabu i za profesionalne korisnike, kao što su tehničari i liječnici osposobljeni za molekularno-biološke tehnike.

## Predviđeni korisnik

Ovaj proizvod namijenjen je da ga upotrebljavaju profesionalni korisnici, kao što su tehničari i liječnici osposobljeni za molekularno-biološke tehnike.

## Opis i načelo

Postupak QIAamp DSP Virus Spin sastoji se od 4 koraka (liza, vezanje, ispiranje i elucija) i izvodi se primjenom kolona QIAamp MinElute® u standardnoj mikrocentrifugi ili automatizirano na instrumentu QIAcube Connect MDx. Postupak je osmišljen kako bi se omogućilo križne kontaminacije između uzoraka svela na najmanju moguću mjeru i omogućilo sigurno rukovanje potencijalno infektivnim uzorcima. Jednostavni postupak QIAamp DSP Virus Spin prikladan je za istovremenu obradu više uzoraka. Komplet QIAamp DSP Virus Spin Kit može se koristiti za izolaciju RNA i DNA iz širokog niza RNA i DNA virusa. Međutim, radne značajke svake vrste virusa nisu utvrđene i korisnik ih mora potvrditi.

### Liza s pomoću enzima QIAGEN Protease (QP)

Liza uzoraka provodi se u vrlo denaturirajućim uvjetima pri povišenim temperaturama. Liza se provodi u prisutnosti enzima QIAGEN Protease (QP) i pufera za lizu (AL), koji u kombinaciji dovode do inaktivacije RNaza.

### Adsorpcija u membranu QIAamp MinElute

Uvjeti vezanja prilagođavaju se dodavanjem etanola kako bi se omogućilo optimalno vezanje RNA i DNA virusa na membranu. Lizati se zatim prenose u kolonu QIAamp MinElute i nukleinske kiseline virusa adsorbiraju se u membranu od silika-gela dok se lizat uvlači centrifugiranjem. Sol i pH uvjeti osiguravaju da se proteini i drugi kontaminanti, prisutni u PCR-u i drugim daljnjim enzimskim reakcijama, ne zadržavaju na membrani QIAamp MinElute.

Epruveta za ispiranje od 2 ml (WT) (isporučena) upotrebljava se u kombinaciji s kolonom QIAamp MinElute tijekom koraka postavljanja i ispiranja.

## Uklanjanje preostalih kontaminanata

Nukleinske kiseline ostaju vezane na membranu dok se kontaminanti učinkovito ispiru tijekom 3 koraka ispiranja.

## Elucija nukleinskih kiselina virusa

U jednom koraku, visokopročišćena RNA i DNA virusa eluiraju se iz membrane kolone QIAamp MinElute u puferu za eluciju (AVE), čija je temperatura izjednačena sa sobnom temperaturom. Kolone QIAamp MinElute omogućavaju minimalne volumene elucije od samo 20 µl u ručnom postupku i 60 µl u automatiziranom postupku. Zbog niskog volumena elucije dobivaju se vrlo koncentrirani eluati nukleinskih kiselina.

Za postupke daljnje obrade u kojima su potrebni mali početni volumeni (npr. neka PCR i RT-PCR ispitivanja) koncentriraniji eluat može povećati osjetljivost ispitivanja.

Za postupke daljnje obrade u kojima je potreban veći početni volumen moguće je povećati volumen elucije do 150 µl u ručnom postupku i do 100 µl u automatiziranom postupku. Međutim, povećanjem volumena elucije smanjit će se koncentracija nukleinskih kiselina u eluatu.

Zbog pufera za eluciju zaostalog u membrani spin kolone nakon centrifuge dobiveni volumen eluata može biti niži od volumena pufera za eluciju dodanog u kolonu. Nadalje, dobiveni volumen eluata ovisi o prirodi uzorka.

Eluirane nukleinske kiseline prikupljaju se u epruvete za eluciju od 1,5 ml (ET, isporučene), a mogu se čuvati na temperaturi od 2 – 8 °C najdulje 24 sata. Za dugotrajnu pohranu dulju od 24 sata preporučujemo čuvanje pročišćenih nukleinskih kiselina na temperaturi od –20 °C.

**Napomena:** stabilnost eluata u velikoj mjeri ovisi o raznim čimbenicima, a povezana je s određenim postupkom daljnje obrade. Ona je za komplet QIAamp DSP Virus Spin Kit procijenjena u kombinaciji s postupcima daljnje obrade koji služe kao primjer. Korisnik je dužan pročitati upute za uporabu određenog postupka daljnje obrade koji se primjenjuje u laboratoriju i/ili potvrditi cjelokupni tijek rada kako bi se odredili odgovarajući uvjeti pohrane.

## Prinos i kvaliteta nukleinskih kiselina virusa

Prinosi nukleinske kiseline virusa izolirane iz bioloških uzoraka obično su manji od 1 µg. Za određivanje prinosa preporučuju se metode kvantitativne amplifikacije. Prilikom kvantifikacije nukleinskih kiselina izoliranih protokolom QIAamp DSP Virus Spin imajte na umu da će u uzorku biti znatno više nosača RNA nego RNA virusa.

Nosač RNA služi dvjema svrhama: prvo, olakšava vezanje nukleinskih kiselina virusa na membranu QIAamp, osobito ako u uzorku ima vrlo malo ciljnih molekula. Drugo, dodavanje velikih količina nosača RNA smanjuje mogućnost degradacije RNA virusa u rijetkom slučaju kad molekule RNaze izbjegnu denaturaciju djelovanjem kaotropnih soli i deterdženta u puferu za lizu (AL). Ako se nosač RNA ne doda u pufer za lizu (AL), to može dovesti do smanjene iskoristivosti RNA ili DNA virusa.

Nosač RNA može biti uključen i u neke reagense za interne kontrole komercijalnih ispitivanja koja se primjenjuju u daljnjoj obradi. U tim slučajevima, pogledajte odgovarajuće upute za uporabu proizvođača ispitivanja koje se primjenjuje u daljnjoj obradi.

Amplifikacijski sustavi razlikuju se po svojoj učinkovitosti, ovisno o ukupnoj količini nukleinskih kiselina prisutnih u reakciji. Eluati iz ovog kompleta sadržavaju i nukleinske kiseline virusa i nosač RNA, a količine nosača RNA uvelike će premašiti količine nukleinskih kiselina virusa. Stoga pri izračunu količine eluata koju treba dodati u daljnje amplifikacije treba uzeti u obzir količinu dodanog nosača RNA. Kako biste postigli najviše razine osjetljivosti u reakcijama amplifikacije, možda će trebati prilagoditi količinu nosača RNA dodanog u pufer za lizu (AL).

## Dodavanje internih kontrola

Za korištenje protokola QIAamp DSP Virus Spin u kombinaciji s komercijalno dostupnim amplifikacijskim sustavima možda će trebati uvesti internu kontrolu u postupak pročišćavanja. Interne kontrole za RNA ili DNA treba zajedno s nosačem RNA dodati u pufer za lizu. Za optimalnu učinkovitost pročišćavanja molekule interne kontrole trebale bi biti dulje od 200 nukleotida s obzirom na to da za manje molekule neće dobiti dovoljan prinos.

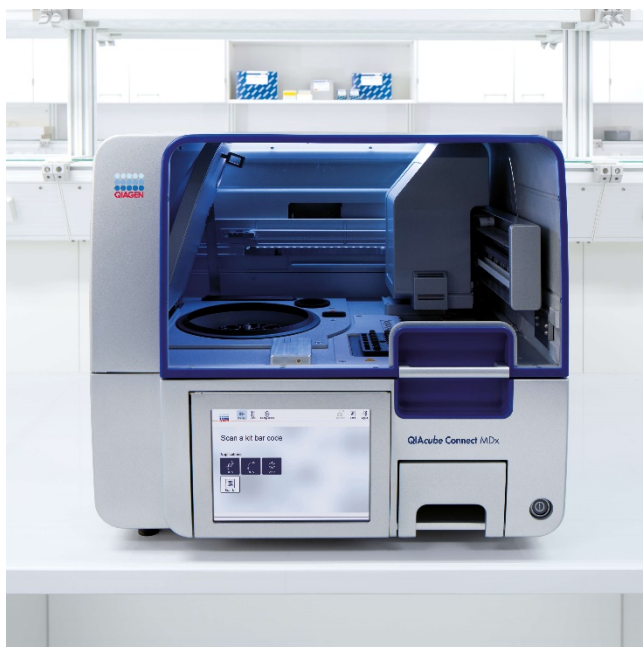
Pogledajte upute proizvođača radi određivanja optimalne koncentracije. Ako se koristi druga koncentracija osim one preporučene, može se smanjiti učinkovitost amplifikacije.

## Automatizirano pročišćavanje nukleinske kiseline virusa na instrumentu QIAcube Connect MDx

Instrument QIAcube Connect MDx provodi automatiziranu izolaciju i pročišćavanje nukleinskih kiselina. Može obraditi do 12 uzoraka u jednom postupku.

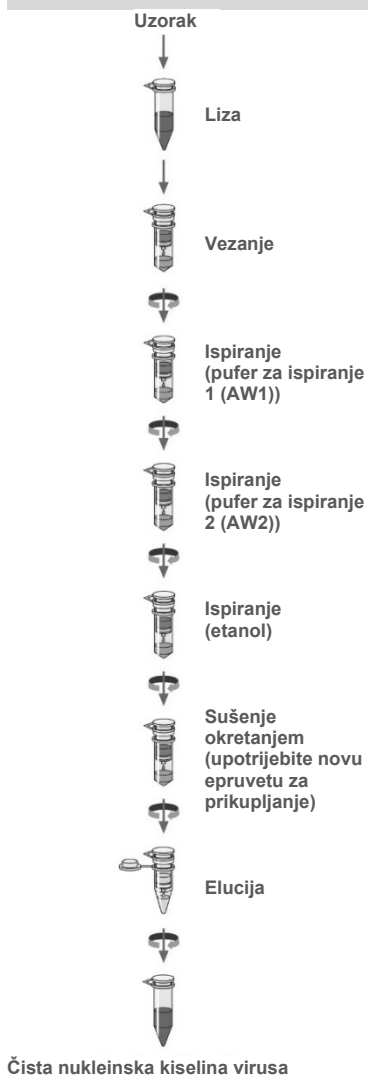
Ako komplet QIAamp DSP Virus Spin Kit upotrebljavate u automatiziranom postupku na QIAcube Connect MDx, moguće je da će instrument obraditi manje od 50 uzoraka zbog mrtvih volumena, isparavanja i dodatne potrošnje reagensa uslijed automatiziranog pipetiranja. QIAGEN jamči 50 priprema uzoraka samo u slučaju primjene kompleta QIAamp DSP Virus Spin Kit u ručnom postupku.





Slika 1. QIAcube Connect MDx.

## Postupak QIAamp DSP Virus Spin



Automatizirano na instrumentu QIAcube Connect MDX

## Sažetak i objašnjenje


U kompletu QIAamp DSP Virus Spin Kit koristi se dobro ispitana tehnologija istovremenog pročišćivanja DNA i RNA virusa. Komplet kombinira svojstva selektivnog vezanja membrane na bazi silika-gela s fleksibilnim volumenima elucije između 20 µl i 150 µl u ručnom tijeku rada.

Postupak je prikladan za uporabu s plazmom i serumom; i jedno i drugo mogu sadržavati citrat ili EDTA. Uzorci mogu biti svježi ili zamrznuti, pod uvjetom da nisu zamrznuti i odmrznuti više od jedanput.

Postupak se može upotrebljavati za izolaciju RNA i DNA virusa iz širokog niza RNA i DNA virusa. Jednostavni postupci centrifugiranja QIAamp DSP prikladni su za istovremenu obradu više uzoraka. Radi povećane standardizacije i jednostavnosti uporabe s volumenima elucije od 60 – 100 µl u koracima povećanja od 5 µl postupak može biti u potpunosti automatiziran na instrumentu QIAcube Connect MDx (stranica 9). Postupak je osmišljen kako bi se izbjegla križna kontaminacija između uzoraka i omogućilo sigurno rukovanje potencijalno infektivnim uzorcima. Nukleinske kiseline virusa eluiraju se u puferu za eluciju (AVE), spremne su za uporabu u reakcijama amplifikacije (PCR) ili pohranu na temperaturi od –20 °C radi kasnije uporabe.

# Uključeni materijali

## Sadržaj kompleta

QIAamp DSP Virus Spin Kit			61704
Kataloški br.			50 <sup>§</sup>
Broj priprema			
QIAamp MinElute	QIAamp MinElute columns with Wash tube (Kolona QIAamp MinElute s epruvetama za ispiranje) (WT) (2 ml)	<b>COL</b>	50
LT	Lysis Tubes (Epruvete za lizu) (2 ml)	<b>LYS TUBE</b>	50
ET	Elution Tubes (Epruvete za eluciju) (1,5 ml)	<b>ELU TUBE</b>	50
WT	Wash tube (Epruvete za ispiranje) (WT) (2 ml)	<b>WASH TUBE</b>	5 x 50
AL	Lysis Buffer (Pufer za lizu)*	<b>LYS BUF</b>	33 ml
AW1	Wash Buffer 1 (Pufer za ispiranje 1) (AW1)* (koncentrat)	<b>WASH BUF 1 CONC</b>	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (Pufer za ispiranje 2) (AW2) <sup>†</sup> (koncentrat)	<b>WASH BUF 2 CONC</b>	13 ml
AVE	Elution Buffer (Pufer za eluciju) <sup>†</sup> (ljubičasti čepovi)	<b>ELU BUF</b>	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent (Otapalo proteaze) <sup>†</sup>	<b>QPROT SOLV</b>	4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (nosač RNA) (crveni čepovi)	<b>CAR RNA</b>	310 µg
QP	QIAGEN Protease (QIAGEN proteaza) (QP) <sup>‡</sup>	<b>QPROT</b>	1 bočica
–	Upute za uporabu (Priručnik)		1

\* Sadržava kaotropne soli. Poduzmite odgovarajuće sigurnosne mjere i prilikom rukovanja nosite rukavice. Nije kompatibilan s dezinficijensima koji sadržavaju izbjeljivač. Za dodatne informacije pogledajte stranicu 16.

<sup>†</sup> Sadržava natrijev azid kao konzervans.

<sup>‡</sup> Pogledajte „Priprema reagensa i pufera“, stranica 26.

<sup>§</sup> Ako komplet QIAamp DSP Virus Spin Kit upotrebljavate u automatiziranom postupku na instrumentu QIAcube Connect MDx, moguće je da će instrument obraditi manje od 50 uzoraka zbog mrtvih volumena, isparavanja i dodatne potrošnje reagensa uslijed automatiziranog pipetiranja. QIAGEN jamči 50 priprema uzoraka samo u slučaju primjene kompleta QIAamp DSP Virus Spin Kit u ručnom postupku.

## Komponente kompleta

Glavne komponente kompleta koje sadržavaju aktivne sastojke objašnjene su u nastavku.

<b>Reagens</b>	<b>Aktivni sastojci</b>	<b>Koncentracija (w/w) [%]</b>
QIAGEN Protease (QP)	Subtilizin	od $\geq 90$ do $\leq 100$
AL	Gvanidin hidroklorid Maleinska kiselina	od $\geq 30$ do $< 50$ od $\geq 0,1$ do $< 1$
AW1	Gvanidin hidroklorid	od $\geq 50$ do $< 70$

# Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

## Dodatni reagensi

- Etanol (96 – 100 %)\*

## Potrošni materijali

- Pipete† i vršci pipeta (radi sprječavanja križne kontaminacije izričito preporučujemo uporabu vršaka pipeta s pregradama za aerosole)
- Rukavice za jednokratnu uporabu

## Oprema

- Blok za zagrijavanje† za lizu uzoraka na temperaturi od 56 °C
- Mikrocentrifuga† (s rotorom za epruvete od 1,5 ml i 2 ml)
- Menzura (50 ml)
- Vorteks miješalica
- Za uzorke < 200 µl: 0,9-postotna otopina NaCl

## Samo za automatizirani postupak

- QIAcube Connect MDx† (kat. br. 9003070)
- Rotor Adapters (kat. br. 990394)
- Rotor Adapter Holder (kat. br. 990392)
- Sample Tubes CB (2 ml, kat. br. 990382, epruveta za unos uzorka)
- Shaker Rack Plugs (kat. br. 9017854)
- Reagent Bottles, 30 ml (kat. br. 990393)
- Filter-Tips, 1000 µl (kat. br. 990352)

\* Ne upotrebljavajte denaturirani alkohol koji sadržava druge tvari kao što su metanol ili metiletilketon.

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

- Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore (kat. br. 990452)
- Filter-Tips, 200 µl (kat. br. 990332)
- SafeSeal Tube, 1,5 ml, Sarstedt® (kat. br. 72.706)

# Upozorenja i mjere opreza

Imajte na umu da ćete ozbiljne štetne događaje koji su nastali u vezi s uređajem, ovisno o lokalnim propisima koje je potrebno proučiti, možda morati prijaviti proizvođaču i/ili njegovu ovlaštenom predstavniku i regulatornom tijelu koje je nadležno za korisnika i/ili pacijenta.

Za in vitro dijagnostičku uporabu.

Prije uporabe kompleta pažljivo pročitajte sve upute.

## Sigurnosne informacije

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS). Oni su dostupni na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-adresi [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati sigurnosno-tehnički list (Safety Data Sheet, SDS) za svaki komplet QIAGEN i komponentu kompleta.



**OPREZ:** NEMOJTE dodavati izbjeljivač ili kisele otopine izravno u otpad nastao pripremom uzoraka.

- Pufer za lizu (AL) i pufer za ispiranje 1 (AW1) sadržavaju gvanidin hidroklorid koji u kombinaciji s izbjeljivačem može stvoriti visoko reaktivne spojeve. Ako se tekućina koja sadržava te pufere prolije, očistite je odgovarajućim laboratorijskim deterdžentom i vodom. Ako prolivena tekućina sadržava potencijalno infektivne agense, očistite zahvaćeno područje najprije laboratorijskim deterdžentom i vodom, a zatim 1-postotnim (v/v) natrijevim hipokloritom.



- Ako su bočice pufera oštećene ili iz njih istječe tekućina, nosite rukavice i zaštitne naočale kada bacate bočice kako biste spriječili vlastite ozljede ili ozljede drugih osoba.
- Tvrtka QIAGEN nije ispitala ima li u tekućem otpadu nastalom u postupcima QIAamp DSP Virus Spin ostataka infektivnih materijala. Kontaminacija tekućeg otpada ostacima infektivnim materijala vrlo je malo vjerojatna, ali nije ju moguće u potpunosti isključiti. Stoga se tekući otpad mora smatrati infektivnim te njime treba postupati i treba ga odlagati u skladu s lokalnim sigurnosnim propisima.
- Ispitci i uzorci potencijalno su zarazni. Odlazite otpad od uzoraka i ispitivanja u skladu s lokalnim sigurnosnim postupcima.

## Informacije za hitne slučajeve

CHEMTREC

SAD i Kanada 1-800-424-9300

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

## Mjere opreza

Sljedeće izjave o opasnosti i mjerama opreza odnose se na komponente kompleta QIAamp DSP Virus Spin Kit:

### Lysis Buffer (AL)



Sadržava: gvanidin hidroklorid, maleinsku kiselinu. Upozorenje! Može biti štetno ako se proguta ili udiše. Nadražuje kožu. Može izazvati alergijsku reakciju na koži. Uzrokuje jako nadraživanje oka. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. U slučaju zdravstvenih tegoba nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika. U slučaju nadraživanja kože ili osipa: Zatražite savjet/pomoć liječnika. Skinuti kontaminiranu odjeću i oprati je prije ponovne uporabe. Odložiti sadržaj/spremnik u odobreno postrojenje za odlaganje otpada.

### Wash Buffer 1 (AW1)



Sadržava: gvanidin hidroklorid. Upozorenje! Štetno ako se proguta ili udiše. Nadražuje kožu. Uzrokuje jako nadraživanje oka. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. Skinuti kontaminiranu odjeću i oprati je prije ponovne uporabe. Odložiti sadržaj/spremnik u odobreno postrojenje za odlaganje otpada.

### QIAGEN Protease (QP)



Sadržava: subtilizin. Opasnost! Štetno ako se proguta. Nadražuje kožu. Uzrokuje teške ozljede oka. Ako se udiše može izazvati simptome alergije ili astme ili poteškoće s disanjem. Može nadražiti dišni sustav. Izbjegavati udisanje prašine/dima/plina/magle/pare/aerosola. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. Nositi sredstva za zaštitu dišnog sustava. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. U SLUČAJU izloženosti ili sumnje na izloženost: Odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika. Osobu premjestiti na svjež zrak i omogućiti mirovanje u položaju udobnom za disanje.

## Odlaganje u otpad

Otpad sadržava uzorke i reagense. Taj otpad može sadržavati otrovne ili zarazne materijale i mora se propisno odložiti. Postupke propisnog odlaganja potražite u lokalnim sigurnosnim propisima.

Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS). Oni su dostupni na mreži u PDF formatu na web-adresi [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati sigurnosno-tehnički list (Safety Data Sheet, SDS) za svaki komplet QIAGEN i komponentu kompleta.

# Pohrana i rukovanje reagensima

Potrebno je paziti na rokove trajanja i uvjete pohrane ispisane na kutiji i naljepnicama svih komponenata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok ili koje su bile nepravilno pohranjene.

Kolone QIAamp MinElute po isporuci treba pohraniti na temperaturu od 2 – 8 °C. U slučaju propisne pohrane kolone QIAamp MinElute stabilne su do datuma isteka roka trajanja navedenog na kutiji kompleta.

**Napomena:** da biste spriječili miješanje komponenti kompleta iz različitih kompleta, označite kolone QIAamp MinElute odgovarajućim brojem serije kompleta.

Svi puferi mogu se pohraniti na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) do datuma isteka roka trajanja navedenog na kutiji kompleta.

Liofilizirani nosač RNA može se pohraniti na sobnoj temperaturi do datuma isteka roka trajanja navedenog na kutiji kompleta.

Liofilizirani enzim QIAGEN Protease (QP) može se čuvati na sobnoj temperaturi sve do datuma isteka roka trajanja kompleta, a da to ne utječe na radne značajke.

## Stabilnost tijekom uporabe

Nosač RNA može se otopiti samo u puferu za eluciju (AVE); samo u ručnom postupku, otopljeni nosač RNA treba odmah dodati u pufer za lizu (AL) kako je opisano na stranici 27. Otopinu treba pripremiti svježu i stabilna je na temperaturi od 2 – 8 °C do 48 sati. Neiskorištene dijelove nosača RNA otopljene u puferu za eluciju (AVE) treba zamrznuti u alikvotima na temperaturi od –20 °C.

Enzim QIAGEN Protease (QP) rekonstituiran u otapalu proteaze (PS) stabilan je do jedne godine kada se čuva na 2 – 8 °C, ali samo do datuma isteka roka trajanja kompleta. Treba izbjegavati čuvanje temeljne standardne otopine QIAGEN Protease (QP) na sobnoj temperaturi dulje vremensko razdoblje.

Rekonstituirani pufer za ispiranje 1 (AW1) i rekonstituirani pufer za ispiranje 2 (AW2) stabilni su do 1 godine kada se čuvaju na sobnoj temperaturi, ali samo do datuma isteka roka trajanja navedenog na kutiji kompleta. Za pripremu pufera za automatizirani postupak slijedite upute iz *korisničkog priručnika za QIAcube Connect MDx*.

# Prikupljanje, pohrana i rukovanje ispitcima

**Napomena:** stabilnost uzorka u velikoj mjeri ovisi o raznim čimbenicima i povezana je s određenim postupkom daljnje obrade. Procijenjena je u kombinaciji s postupcima daljnje obrade koji služe kao primjer. Korisnik je dužan pročitati upute za uporabu određenog postupka daljnje obrade koji se primjenjuje u laboratoriju i/ili potvrditi cjelokupni tijek rada kako bi se odredili odgovarajući uvjeti pohrane.

Za opće preporuke za prikupljanje, transport i pohranu pogledajte smjernicu MM13-A „Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods” (Prikupljanje, transport, priprema i pohrana ispitaka za molekularne metode) koju je odobrio institut Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Nadalje, tijekom pripreme, pohrane, transporta i općenitog rukovanja uzorcima morate se pridržavati uputa proizvođača za odabrani uređaj za prikupljanje uzoraka.

Postupak pročišćavanja optimiziran je za uporabu s uzorcima humane plazme i seruma. Uzorci krvi tretirani EDTA-om ili citratom kao antikoagulansom mogu se upotrebljavati za pripremu plazme. Uzorci mogu biti svježiji ili zamrznuti, pod uvjetom da nisu zamrznuti i odmrznuti više od jedanput. Odmrznite zamrznute uzorke pažljivim tresenjem kako biste osigurali temeljito miješanje.

Nakon uzimanja i centrifugiranja plazma ili serum mogu se pohraniti na 2 – 8 °C na maksimalno 6 sati. Za dugoročnu pohranu preporučuje se zamrzavanje u alikvotima na temperaturi od –20 °C do –80 °C. Zamrznuti uzorci plazme ili seruma ne smiju se odmrzavati više od jedanput. Ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje dovodi do denaturacije i precipitacije proteina, što rezultira smanjenjem titra virusa te stoga i smanjenim prinosima nukleinskih kiselina virusa. Osim toga, krioprecipitati koji se formiraju tijekom postupka zamrzavanja i odmrzavanja začepit će membranu QIAamp MinElute. Ako su vidljivi krioprecipitati, talog se može razgraditi centrifugiranjem na približno 6800 x g u trajanju od 3 minute. Razbistreni supernatant treba odvojiti i odmah obraditi, a da se pritom ne poremeti talog. Odmah započnite postupak pročišćavanja. Centrifugiranje pri niskim gravitacijskim silama ne smanjuje virusne titre.

**Napomena:** prema ispitivanjima interferencije za komplet QIAamp DSP Virus Spin Kit koja služe kao primjer te u skladu s normom ISO 20186-2:2019(E), heparin iz epruveta za prikupljanje krvi može utjecati na čistoću izoliranih nukleinskih kiselina, a eventualni prijenos u eluate može uzrokovati inhibicije u nekim postupcima daljnje obrade. Zbog toga preporučujemo uporabu uzoraka krvi tretiranih EDTA-om ili citratom kao antikoagulansom.

# Važne napomene

## Važne točke prije započinjanja

- Po primitku kompleta provjerite komponente kompleta kako biste potvrdili da nema oštećenja. Ako su blister pakiranja ili bočice pufera oštećene, obratite se tehničkoj službi tvrtke QIAGEN ili lokalnom distributeru. Ako dođe do prolijevanja tekućina, pogledate „Upozorenja i mjere opreza” (stranica 16). Nemojte upotrebljavati oštećene komponente kompleta jer njihova uporaba može dovesti do loših radnih značajki kompleta.
- Uvijek upotrebljavajte opremu bez RNaze.
- Uvijek promijenite vrške pipeta između dva prijenosa tekućina. Kako biste križnu kontaminaciju sveli na najmanju moguću mjeru, preporučujemo uporabu vršaka pipeta s pregradama za aerosole.
- Uvijek upotrebljavajte rukavice za jednokratnu uporabu i redovito provjeravajte da nisu kontaminirane materijalom uzorka. Bacite rukavice ako se kontaminiraju.
- Kako biste sveli križnu kontaminaciju na najmanju moguću mjeru, otvarajte samo jednu po jednu epruvetu.
- Nakon svih koraka pulsiranja na vorteks miješalici kratko centrifugirajte epruvete za mikrocentrifugu kako biste uklonili kapljice s unutarnje strane poklopca.
- Svi koraci centrifugiranja izvode se na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C).
- Korisnik mora osigurati da sljedivost uzoraka bude zadržana tijekom čitavog postupka.
- Nemojte upotrebljavati komponente iz drugih kompleta u kombinaciji s kompletima koje trenutno upotrebljavate, osim ako su brojevi serije identični.
- Spriječite kontaminaciju reagensa u kompletu mikroorganizmima.
- Kako biste rizik od infekcije potencijalno zaraznim materijalom sveli na najmanju moguću mjeru, preporučujemo rad u uvjetima laminarnog protoka zraka sve dok se uzorci ne liziraju.
- U automatiziranom postupku, slijedite upute na korisničkom sučelju (QIAcube Connect MDx) i pogledajte odgovarajući korisnički priručnik (za QIAcube Connect MDx).
- Komplet smije upotrebljavati samo osoblje koje je obučeno za in vitro dijagnostičke laboratorijske postupke.



## Rukovanje kolonama QIAamp MinElute

Zbog osjetljivosti tehnologija amplifikacije nukleinske kiseline, potrebno je poduzeti sljedeće mjere opreza prilikom rukovanja kolonama QIAamp MinElute kako biste spriječila križna kontaminacija između priprema uzoraka:

- Pažljivo dodajte uzorak ili otopinu u kolonu QIAamp MinElute. Pipetirajte uzorak u kolonu QIAamp MinElute, a da pritom ne navlažite rub kolone.
- Uvijek promijenite vrške pipeta između svih prijenosa tekućina. Preporučuje se uporaba vršaka pipeta s pregradama za aerosole.
- Izbjegnite dodirivanje membrane QIAamp MinElute vrškom pipete.
- Istovremeno otvarajte samo jednu kolonu QIAamp MinElute i pripazite da spriječite nastanak aerosola.

## Centrifugiranje

- Epruvete za ispiranje (WT) i epruvete za eluciju za sve korake centrifugiranja isporučuju se zajedno s kompletom.
- Centrifugiranje kolona QIAamp MinElute izvodi se na približno 6000 x g kako bi se smanjila buka centrifuge. Centrifugiranje kolona QIAamp MinElute na punoj brzini neće utjecati na prinos DNA ili RNA.
- Centrifugiranje treba izvoditi pri punoj brzini za sušenje okretanjem na kraju postupka ispiranja i za eluciju.
- Svi koraci centrifugiranja trebaju se izvoditi na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C).

## Obrada kolona QIAamp MinElute u mikrocentrifugi

- Zatvorite kolonu QIAamp MinElute prije nego što je postavite na mikrocentrifugu. Centrifugirajte u skladu s uputama.
- Izvadite kolonu QIAamp MinElute i epruvetu za ispiranje (WT) iz mikrocentrifuge.

- Postavite kolonu QIAamp MinElute u novu epruvetu za ispiranje (WT). Bacite filtrat i epruvetu za ispiranje (WT). Imajte na umu da filtrat može sadržavati opasan otpad i treba ga odložiti na prikladan način.
- Istovremeno otvarajte samo jednu kolonu QIAamp MinElute i pripazite da spriječite nastanak aerosola.

Za učinkovitu paralelnu obradu više uzoraka preporučujemo punjenje nosača epruvetama za ispiranje (WT) tako da se kolone QIAamp MinElute mogu prenijeti nakon centrifugiranja. Iskorištene epruvete za ispiranje (WT) koje sadržavaju filtrat mogu se baciti, a nove epruvete za ispiranje (WT) koje sadržavaju kolone QIAamp MinElute mogu se postaviti izravno na mikrocentrifugu.

## Priprema reagensa i pufera

### Priprema RNA

Prilikom pripreme RNA virusa, radite brzo tijekom ručnih koraka postupka i prije početka izvođenja postupka pročitajte Prilog na stranici 46.

### Priprema enzima QIAGEN Protease (QP)

Dodajte cijeli sadržaj bočice koja sadržava 4,4 ml otapala proteaze (PS) u bočicu liofiliziranog enzima QIAGEN Protease (QP) i pažljivo promiješajte. Kako biste izbjegli stvaranje pjene, promiješajte preokretanjem bočice nekoliko puta. Pobrinite se da se enzim QIAGEN Protease (QP) u potpunosti otopi.



Nemojte dodavati enzim QIAGEN Protease (QP) izravno u pufer za lizu (AL).\*


\* Sadržava kaotropne soli. Poduzmite odgovarajuće mjere za sigurnost u laboratoriju i prilikom rukovanja nosite rukavice. Nije kompatibilan s dezinficijensima koji sadržavaju izbjeljivač. Sigurnosne informacije potražite na stranici 16.

## Dodavanje nosača RNA i interne kontrole puferu za lizu (AL)\* (samo za ručni postupak)

Uporaba interne kontrole izričito se preporučuje kada se komplet QIAamp DSP Virus Spin Kit upotrebljava u kombinaciji s dijagnostičkim amplifikacijskim sustavima. Dodatne informacije potražite u uputama proizvođača. Internu kontrolu i rekonstituirani nosač RNA treba dodati puferu za lizu (AL) i nježno promiješati preokretanjem epruvete 10 puta. Kako biste izbjegli stvaranje pjene, nemojte miješati na vorteks miješalici. Ako se upotrebljava interna kontrola, na odgovarajući način smanjite volumen pufera za lizu (AL) (za dodatne pojedinosti pogledajte tablicu 1).

Pogledajte upute proizvođača kako biste odredili optimalnu koncentraciju interne kontrole. Uporaba koncentracije koja nije preporučena može dovesti do netočnih rezultata. Pri izračunavanju točne količine interne kontrole koja će biti upotrijebljena uzmite u obzir početni volumen uzorka i volumen elucije. Imajte na umu da komplet QIAamp DSP Virus Spin Kit upotrebljava početni volumen uzorka od 200 µl.

Kako biste pripremili otopinu nosača RNA, dodajte 310 µl pufera za eluciju (AVE) u epruvetu koja sadržava 310 µg liofiliziranog nosača RNA kako biste dobili otopinu od 1 µg/µl. Dobro otopite nosač RNA, podijelite ga u alikvote prikladne veličine i pohranite na temperaturi od –20 °C. Nemojte zamrzavati i odmrzavati alikvote nosača RNA više od 3 puta.

 Nosač RNA ne otapa se u puferu za lizu (AL). Prvo ga morate otopiti u puferu za eluciju (AVE), a zatim dodati u pufer za lizu (AL). Prije nego što ga pomiješate s puferom za lizu (AL), provjerite je li se nosač RNA u potpunosti otopio u odgovarajućem volumenu pufera za eluciju (AVE).

Izračunajte potreban volumen mješavine pufera za lizu (AL) i nosača RNA po seriji uzoraka odabirom broja uzoraka koji će se istovremeno obrađivati iz tablice 1, stranica 29. Za veći broj uzoraka volumeni se mogu izračunati jednačžbom za izračun uzoraka navedenom u nastavku:

$$n \times 0,22 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 28 \text{ } \mu\text{l/ml} = z \text{ } \mu\text{l}$$

pri čemu je:  $n$  = broj uzoraka koji će se istovremeno obrađivati

$y$  = izračunati volumen pufera za lizu (AL)

$z$  = volumen mješavine nosača RNA i pufera za eluciju (AVE) koja će se dodati u pufer za lizu (AL)

Lagano promiješajte preokretanjem epruvete 10 puta. Kako biste izbjegli stvaranje pjene, nemojte miješati na vorteks miješalici.

**Tablica 1. Volumeni (vol.) pufera za lizu (AL) i mješavine nosača RNA i pufera za eluciju (AVE) potrebni za određeni broj (br.) uzoraka za postupak QIAamp DSP Virus Spin\***

Br. uzoraka	Vol. pufera za lizu (AL)* (ml)	Vol. mješavine nosača RNA i pufera AVE (µl)	Br. uzoraka	Vol. pufera za lizu (AL)* (ml)	Vol. mješavine nosača RNA i pufera AVE (µl)
1	0,22 ml	6,2 µl	13	2,86 ml	80,1 µl
2	0,44 ml	12,3 µl	14	3,08 ml	86,3 µl
3	0,66 ml	18,5 µl	14	3,30 ml	92,4 µl
4	0,88 ml	24,6 µl	16	3,52 ml	98,6 µl
5	1,10 ml	30,8 µl	17	3,74 ml	104,7 µl
6	1,32 ml	37,0 µl	18	3,96 ml	110,9 µl
7	1,54 ml	43,1 µl	19	4,18 ml	117,0 µl
8	1,76 ml	49,3 µl	20	4,40 ml	123,2 µl
9	1,98 ml	55,4 µl	21	4,62 ml	129,4 µl
10	2,20 ml	61,6 µl	22	4,84 ml	135,5 µl
11	2,42 ml	67,8 µl	23	5,06 ml	141,7 µl
12	2,64 ml	73,9 µl	24	5,28 ml	147,8 µl



Postupak pripreme uzoraka optimiziran je za 5,6 µg nosača RNA po uzorku. Ako se pokaže da je manja količina nosača RNA bolja za vaš amplifikacijski sustav, prenesite samo potrebnu količinu otopljenog nosača RNA u epruvete koje sadržavaju pufer za lizu (AL). Za svaki mikrogram nosača RNA potreban za pripremu dodajte 5 µl mješavine pufera za eluciju (AVE) i otopljenog nosača RNA po mililitru pufera za lizu (AL). Uporaba volumena nosača RNA manjeg od 5,6 µg po uzorku mora se potvrditi za svaku određenu vrstu uzorka i daljnji postupak ispitivanja.

\*Ako se upotrebljava interna kontrola, na odgovarajući način smanjite volumen pufera za lizu (AL).

Pri automatiziranom postupku, pripremite nosač RNA u puferu AVE na prethodno opisan način (kako biste dobili otopinu od 1 µg/µl). U sljedećem koraku, u instrument QIAcube Connect MDx dodajte dovoljno otopine nosača RNA za potreban broj uzoraka plus dva dodatna uzorka. Potrebna količina prikazuje se na korisničkom sučelju tijekom učitavanja. Dodavanje nosača RNA puferu za lizu (AL) izvodi instrument QIAcube Connect MDx.

Mješavina interne kontrole bit će pripremljena kako je opisano na zaslonu instrumenta QIAcube MDx. Interna kontrola bit će dodana mješavini nosača RNA i pufera AVE.

## Priprema pufera za ispiranje 1 (AW1)\*

Koristeći se menzurom, dodajte 25 ml etanola (96 – 100 %) u bočicu koja sadržava 19 ml koncentrata pufera za ispiranje 1 (AW1), prema uputama na bočici. Kvačicom označite kućicu na oznaci kako biste naznačili da je etanol dodan. Pohranite rekonstituirani pufer za ispiranje 1 (AW1) na sobnoj temperaturi.



Rekonstituirani pufer za ispiranje 1 (AW1) uvijek miješajte tako da bočicu nekoliko puta preokrenete prije nego što započnete postupak.

## Priprema pufera za ispiranje 2 (AW2)†

Koristeći se menzurom, dodajte 30 ml etanola (96 – 100 %) u bočicu koja sadržava 13 ml koncentrata pufera za ispiranje 2 (AW2), prema uputama na bočici. Kvačicom označite kućicu na oznaci kako biste naznačili da je etanol dodan. Pohranite rekonstituirani pufer za ispiranje 2 (AW2) na sobnoj temperaturi.



Rekonstituirani pufer za ispiranje 2 (AW2) uvijek miješajte tako da bočicu nekoliko puta preokrenete prije nego što započnete postupak.

## Priprema pufera za eluciju (AVE)

S kompletom su isporučene četiri epruvete pufera za eluciju (AVE). Pazite da ne kontaminirate pufer RNazama. Ako s pomoću jednog kompleta izvodite 4 postupka pročišćavanja ili manje, preporučujemo da bacite epruvetu pufera za eluciju (AVE) na kraju svakog postupka.

\* Sadržava kaotropne soli. Poduzmite odgovarajuće mjere za sigurnost u laboratoriju i prilikom rukovanja nosite rukavice. Nije kompatibilan s dezinficijensima koji sadržavaju izbjeljivač. Sigurnosne informacije potražite na stranici 16.

† Sadržava natrijev azid kao konzervans.

# Protokol: pročišćavanje nukleinskih kiselina virusa iz plazme ili seruma primjenom mikrocentrifuge ili instrumenta QIAcube Connect MDx

Za pročišćavanje nukleinskih kiselina virusa iz 200 µl plazme ili seruma tretiranih EDTA-om ili citratom primjenom kompleta QIAamp DSP Virus Spin Kit s pomoću mikrocentrifuge ili automatizirano na instrumentu QIAcube Connect MDx.

## Važne točke prije započinjanja

- U postupku u nastavku navedene su upute za obradu jednog uzorka. Međutim, moguće je obrađivati nekoliko uzoraka istovremeno; broj ovisi o kapacitetu mikrocentrifuge koja se upotrebljava.
- Automatiziranu obradu 2 – 10 ili 12 uzoraka možete provesti na instrumentu QIAcube Connect MDx.
- Za automatizirani postupak slijedite upute na korisničkom sučelju (QIAcube Connect MDx) i pogledajte korisnički priručnik za QIAcube Connect MDx.

## Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Ostavite uzorke da se izjednače sa sobnom temperaturom (15 – 25 °C) i pobrinite se da su dobro promiješani.
- Pobrinite se da su svi reagensi i kolone QIAamp MinElute (u zatvorenim blisterima) izjednačeni sa sobnom temperaturom.
- Postavite blok za grijanje na 56 °C za uporabu u koraku 4 (potreban za ručni postupak i automatizirani postupak s ručnim liziranjem izvan instrumenta).

- Pobrinite se da su pufer za ispiranje 1 (AW1), pufer za ispiranje 2 (AW2) i enzim QIAGEN Protease (QP) pripremljeni prema uputama na stranicama 26–30.
- Ako se u puferu za lizu (AL) formirao talog, otopite ga inkubiranjem na temperaturi od 56 °C.
- Dodajte nosač RNA rekonstituiran u puferu za eluciju (AVE) u pufer za lizu (AL) prema uputama na stranici 27 (samo za ručni postupak).
- Po mogućnosti za svaki postupak upotrijebite svježi pufer za eluciju (AVE) (isporučene su 4 epruvete).
- Postupci kontrole kvalitete u tvrtki QIAGEN uključuju funkcionalno ispitivanje kompleta prije njegova stavljanja na tržište za svaku pojedinačnu seriju kompleta. Stoga nemojte miješati reagense iz različitih serija kompleta i nemojte kombinirati pojedinačne reagense iz različitih serija reagensa.

## Postupak

- Za ručni postupak s mikrocentrifugom slijedite korake 1 – 15.
  - Ovaj postupak moguće je automatizirati na instrumentu QIAcube Connect MDx u dvije različite inačice:
    - Plasma or Serum\_Standard (Plazma ili Serum\_standardno): puna automatizacija primjenom 200 µl uzorka (automatizacija započinje od 1. koraka)
    - Plasma or Serum\_Manual lysis (Plazma ili Serum\_ručno liziranje): djelomična automatizacija s ručnim liziranjem izvan instrumenta primjenom volumena početnog uzorka od 200 µl (automatizacija započinje nakon koraka 5)
1. Pipetirajte 25 µl enzima QIAGEN Protease (QP) u epruvetu za lizu (LT).



Prije uporabe provjerite datum isteka roka trajanja rekonstituirane proteaze.



2. Dodajte 200 µl plazme ili seruma u epruvetu za lizu (LT).

**Napomena:** ako je volumen uzorka manji od 200 µl, dodajte odgovarajući volumen 0,9-postotne otopine natrijeva klorida kako biste dobili volumen proteaze i uzorka od ukupno 225 µl.

3. Dodajte 200 µl pufera za lizu (AL) (koji sadržava 28 µg/ml nosača RNA i opcionalno internu kontrolu). Začepite i promiješajte pulsiranjem na vorteks miješalici u trajanju od  $\geq 15$  s.

Kako biste osigurali učinkovitu lizu, neophodno je da se uzorak i pufer za lizu (AL) temeljito promiješaju kako bi se dobila homogena otopina.



Pufer za lizu (AL) sadržava internu kontrolu. S obzirom na to da pufer za lizu (AL) ima veliku viskoznost, obavezno pažljivim pipetiranjem dodajte točan volumen pufera za lizu (AL).



Nemojte dodavati enzim QIAGEN Protease (QP) izravno u pufer za lizu (AL).

4. U bloku za zagrijavanje inkubirajte na temperaturi od 56 °C u trajanju od 15 minuta.

5. Kratko centrifugirajte epruvetu za lizu (LT) kako biste uklonili kapljice s unutarnje strane poklopca.

**Napomena:** ako je ručno liziranje (koraci 1 – 15) provedeno izvan instrumenta, sljedeće korake (korake 6 – 15) moguće je automatizirati: „Manual lysis protocol” (Protokol za ručno liziranje) na instrumentu QIAcube Connect MDx.

6. Dodajte 250 µl etanola (96 – 100 %) u uzorak, zatvorite poklopac i dobro promiješajte pulsiranjem na vorteks miješalici u trajanju od  $\geq 15$  s. Inkubirajte lizat s etanolom 5 minuta na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C).

7. Kratko centrifugirajte epruvetu kako biste uklonili kapljice s unutarnje strane poklopca.

8. Pažljivo dodajte sav lizat iz koraka 7 u kolonu QIAamp MinElute, a da pritom ne navlažite rub. Začepite i centrifugirajte na približno 6000 x g u trajanju > 1 minute. Postavite kolonu QIAamp MinElute u čistu epruvetu za ispiranje (WT) od 2 ml i bacite epruvetu za ispiranje (WT) koja sadržava filtrat.



Ako lizat nije u potpunosti prošao kroz kolonu nakon centrifugiranja, ponovno centrifugirajte na većoj brzini dok kolona QIAamp MinElute ne bude prazna.

9. Pažljivo otvorite kolonu QIAamp MinElute i dodajte 500 µl pufera za ispiranje 1 (AW1), a da pritom ne navlažite rub. Začepite i centrifugirajte na približno 6000 x g u trajanju  $\geq 1$  minute. Postavite kolonu QIAamp MinElute u čistu epruvetu za ispiranje (WT) od 2 ml i bacite epruvetu za ispiranje (WT) koja sadržava filtrat.
10. Pažljivo otvorite kolonu QIAamp MinElute i dodajte 500 µl pufera za ispiranje 2 (AW2), a da pritom ne navlažite rub. Začepite i centrifugirajte na približno 6000 x g u trajanju  $> 1$  minute. Postavite kolonu QIAamp MinElute u čistu epruvetu za ispiranje (WT) od 2 ml i bacite epruvetu za ispiranje (WT) koja sadržava filtrat.
11. Pažljivo otvorite kolonu QIAamp MinElute i dodajte 500 µl etanola (96 – 100 %), a da pritom ne navlažite rub. Začepite i centrifugirajte na približno 6000 x g u trajanju  $> 1$  minute. Bacite epruvetu za ispiranje (WT) koja sadržava filtrat.



Prijenos etanola u eluat može uzrokovati probleme u postupcima daljnje obrade. Neki rotori za centrifugiranje mogu vibrirati nakon usporavanja, zbog čega nevezana frakcija koja sadržava etanol dolazi u doticaj s kolonom QIAamp MinElute. Uklanjanje kolone QIAamp MinElute i epruvete za ispiranje (WT) iz rotora također može dovesti do toga da nevezana frakcija dođe u kontakt s kolonom QIAamp MinElute.

12. Postavite kolonu QIAamp MinElute u čistu epruvetu za ispiranje (WT) od 2 ml. Centrifugirajte pri punoj brzini (približno 20.000 x g) u trajanju od 3 minute kako biste u potpunosti osušili membranu.



Ako ne izvedete sušenje centrifugiranjem, može doći do inhibicije postupka daljnjeg ispitivanja.

13. Postavite kolonu QIAamp MinElute u novu epruvetu za ispiranje (WT) od 2 ml, otvorite poklopac i inkubirajte sklop na 56 °C u trajanju od 3 minute kako bi sva preostala tekućina isparila i kako bi se membrana u potpunosti osušila.

14. Postavite kolonu QIAamp MinElute u novu epruvetu za eluciju (ET) i bacite epruvetu za ispiranje (WT) s filtratom. Pažljivo otvorite poklopac kolone QIAamp MinElute i dodajte 20 –150 µl pufera za eluciju (AVE) u središte membrane.



Važno je da upotrijebite novu epruvetu za eluciju kako biste izbjegli kontaminaciju preostalim puferima za ispiranje koja može dovesti do inhibicije daljnjeg postupka ispitivanja.



Doziranje pufera za eluciju u središte membrane posebno je važno u slučaju manjih volumena elucije kako bi se osiguralo optimalno dobivanje nukleinskih kiselina i pufera za eluciju.



Volumen elucije može se prilagoditi u skladu sa zahtjevima postupaka daljnje obrade. U automatiziranom tijeku rada mogući su volumeni elucije od 60 – 100 µl u koracima povećanja od 5 µl. Imajte na umu da dobiveni volumen eluata može biti manji od volumena pufera za eluciju dodanog u kolonu zbog preostalog pufera za eluciju koji je zaostao u membrani spin kolone nakon centrifugiranja.



Provjerite je li pufer za eluciju izjednačen sa sobnom temperaturom.

15. Zatvorite poklopac i inkubirajte na sobnoj temperaturi u trajanju od  $\geq 3$  minute. Centrifugirajte pri punoj brzini (približno 20.000 x g) u trajanju od 1 minute.



Poklopce epruveta za eluciju okrenite tako da su usmjereni prema smjeru suprotnom od rotacije rotora (npr. ako se rotor okreće u smjeru kazaljke na satu, okrenite poklopce u smjeru suprotnom od smjera kazaljke na satu).



U slučaju svih automatiziranih postupaka uklonite eluate iz instrumenta neposredno nakon završetka postupka i pravilno ih pohranite.

## Kontrola kvalitete

U skladu sa sustavom za upravljanje kvalitetom društva QIAGEN certificiranim u skladu s normom ISO, svaka serija kompleta QIAamp DSP Virus Spin Kit ispituje se prema unaprijed određenim specifikacijama kako bi se osigurala dosljedna kvaliteta proizvoda.

## Ograničenja

Radne značajke sustava utvrđene su ispitivanjima s procjenom radnih značajki pri pročišćavanju nukleinskih kiselina virusa iz uzoraka humane plazme i seruma.

Korisnik je dužan potvrditi radne značajke sustava za sve postupke koji se izvode u laboratoriju, a koje ne pokrivaju ispitivanja radnih značajki koje je provela tvrtka QIAGEN.

Kako bi se rizik od negativnog utjecaja na dijagnostičke rezultate sveo na najmanju moguću mjeru, u postupcima daljnje obrade trebaju se upotrijebiti odgovarajuće kontrole. Svi generirani dijagnostički rezultati moraju se tumačiti zajedno s drugim kliničkim ili laboratorijskim nalazima.

## Radne značajke

Važeće radne značajke možete pronaći na kartici s resursima stranice proizvoda na web-mjestu [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za više informacija pogledajte i stranicu s najčešćim pitanjima u našem Centru za tehničku podršku: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Znanstvenici u tehničkim službama tvrtke QIAGEN uvijek će rado odgovoriti na sva pitanja koja biste mogli imati, a koja se odnose na informacije i/ili postupke u ovom priručniku ili na tehnologije za uzorke i ispitivanja (za informacije za kontakt posjetite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentari i prijedlozi

---

### Općenito rukovanje

- a) Začepljenje vršaka pipete tijekom prijenosa uzorka
- Zamrznuti uzorci nisu dobro promiješani nakon odmrzavanja. Odmrznite zamrznute uzorke pažljivim tresenjem kako biste osigurali temeljito miješanje. Krioprecipitati koji se formiraju tijekom postupka zamrzavanja i odmrzavanja začepit će membranu QIAamp MinElute. Ako su krioprecipitati vidljivi, razbistrite uzorak centrifugiranjem u trajanju od 5 minuta pri 16.000 x g.
- b) Začepljena kolona QIAamp MinElute
- Ako lizat nije u potpunosti prošao kroz membranu nakon centrifugiranja pri 6000 x g (8000 o/min), ponovno centrifugirajte pri punoj brzini (do 20.800 x g) u trajanju od 1 minute.
- Ako lizat ponovno ne prođe kroz membranu tijekom centrifugiranja, bacite uzorak i ponovite postupak izolacije i pročišćavanja s pomoću novog materijala uzorka, počevši od koraka 1.
- Krioprecipitati koji se formiraju tijekom postupka zamrzavanja i odmrzavanja začepit će membranu kolone QIAamp MinElute. Ako su krioprecipitati vidljivi, razbistrite uzorak centrifugiranjem u trajanju od 5 minuta pri 16.000 x g.
- Uporaba etanola ohlađenog na ledu tijekom lize može pomoći u smanjivanju rizika od začepljivanja membrane. Nadalje, od ključne je važnosti da pufer za lizu dodate pravilnim redoslijedom koji je prethodno naveden. Nemojte dodavati enzim QIAGEN Protease (QP) izravno u pufer za lizu (AL).

## Komentari i prijedlozi

---

- c) U puferu za lizu formirao se precipitat Otopite ga inkubiranjem pufera za lizu (AL) na temperaturi od 56 °C.
- d) Različiti volumeni elucije Volumen dobivenog eluata ovisi o naravi uzorka.  
Zbog pufera za eluciju zaostalog u membrani spin kolone nakon centrifuge dobiveni volumen eluata može biti niži od volumena pufera za eluciju dodanog u kolonu.  
Dodajte pufer za eluciju u središte membrane. Doziranje pufera za eluciju u središte membrane posebno je važno u slučaju manjih volumena elucije kako bi se osiguralo optimalno dobivanje nukleinskih kiselina i pufera za eluciju.
- e) U slučaju problema u automatiziranom tijeku rada Pogledajte *korisnički priručnik za QIAcube Connect MDx*.

---

### DNA nema dobar učinak u postupcima daljnje obrade

- a) Nepotpuna liza uzorka Ako je enzim QIAGEN Protease (QP) dulje vrijeme izložen povišenoj temperaturi, može izgubiti svoju aktivnost. Ponovite postupak s pomoću novih uzoraka i svježeg enzima QIAGEN Protease (QP).  
Obavezno otopite enzim QIAGEN Protease (QP) otapalom proteaze prema prethodno navedenim uputama. Kako biste izbjegli stvaranje pjene, promiješajte preokretanjem bočice nekoliko puta. Pobrinite se da se enzim QIAGEN Protease (QP) u potpunosti otopi. Nemojte dodavati enzim QIAGEN Protease (QP) izravno u pufer za lizu (AL).  
Kako biste osigurali učinkovitu lizu, neophodno je da se uzorak i pufer za lizu (AL) temeljito promiješaju kako bi se dobila homogena otopina. S obzirom na to da pufer za lizu (AL) ima veliku viskoznost, obavezno pažljivim pipetiranjem odgovarajućom pipetom dodajte točan volumen pufera za lizu (AL).



## Komentari i prijedlozi

---

- b) Umjesto etanola koncentracije od 96 – 100 % upotrijebljen je niskopostotni etanol
- Ponovite postupak pročišćavanja s pomoću novih uzoraka i etanola koncentracije od 96 – 100 %. Ne upotrebljavajte denaturirani alkohol koji sadržava druge tvari kao što su metanol ili metiletiketon.
- c) Pufer za ispiranje 1 (AW1) ili pufer za ispiranje 2 (AW2) nisu pravilno pripremljeni
- Prije započinjanja postupka pobrinite se da su koncentri pufera za ispiranje 1 (AW1) i pufera za ispiranje 2 (AW2) razrijeđeni odgovarajućim volumenom etanola koncentracije od 96 – 100 % i promiješani preokretanjem bočice nekoliko puta.
- d) Uzorci plazme i seruma nisu pravilno pripremljeni, pohranjeni ili promiješani
- Postupak pročišćavanja optimiziran je za uporabu s uzorcima humane plazme i seruma. Uzorci krvi tretirani EDTA-om ili citratom kao antikoagulansom mogu se upotrebljavati za pripremu plazme. Nakon uzimanja i centrifugiranja plazma ili serum mogu se pohraniti na 2 – 8 °C na maksimalno 6 sati. Za dugoročnu pohranu preporučuje se zamrzavanje u alikvotima na temperaturi od –80 °C do –20 °C.
- Zamrznuti uzorci plazme ili seruma ne smiju se odmrzavati više od jedanput. Ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje dovodi do denaturacije i precipitacije proteina, što rezultira smanjenjem titra virusa te stoga i smanjenim prinosima nukleinskih kiselina virusa.
- Odmrznite zamrznute uzorke pažljivim tresenjem kako biste osigurali temeljito miješanje.
- e) Mala količina DNA ili nema DNA u eluatu
- Smanjite volumen elucije ili po mogućnosti povećajte količinu eluata koji se dodaje u reakciju.














## Komentari i prijedlozi

---

- f) Upotrijebljen je neodgovarajući volumen elucije
- Odredite maksimalni volumen eluata primjeren za postupak daljnje obrade. U skladu s time smanjite ili povećajte volumen eluata koji se dodaje u postupku daljnje obrade. Volumen elucije može se proporcionalno prilagoditi. Elucija s manjim volumenima pufera za eluciju (AVE) dovodi do viših koncentracija nukleinske kiseline.
- g) Prijenos potencijalnih inhibitora
- Prije elucije obavezno izvedite korak sušenja centrifugiranjem kako biste spriječili potencijalnu inhibiciju daljnjeg postupka ispitivanja.
- Važno je da upotrijebite novu epruvetu za eluciju kako biste izbjegli kontaminaciju preostalim puferima za ispiranje koja može dovesti do inhibicije daljnjeg postupka ispitivanja.
- Prema ispitivanjima interferencije za komplet QIAamp DSP Virus Spin Kit koja služe kao primjer te u skladu s normom ISO 20186-2:2019(E), heparin iz epruveta za prikupljanje krvi može utjecati na čistoću izoliranih nukleinskih kiselina, a eventualni prijenos u eluate može uzrokovati inhibicije u nekim postupcima daljnje obrade. Zbog toga preporučujemo uporabu uzoraka krvi tretiranih EDTA-om ili citratom kao antikoagulansom.
- h) Narušena kvaliteta / nepravilna priprema nosača RNA
- Nosač RNA služi dvjema svrhama: prvo, olakšava vezanje nukleinskih kiselina virusa na membranu QIAamp, osobito ako u uzorku ima vrlo malo ciljnih molekula. Drugo, dodavanje velikih količina nosača RNA smanjuje mogućnost degradacije RNA virusa u rijetkom slučaju kad molekule RNaze izbjegnu denaturaciju djelovanjem kaotropnih soli i deterdženta u puferu za lizu (AL).
- Ako se nosač RNA ne doda u pufer za lizu (AL), to može dovesti do smanjene iskoristivosti RNA ili DNA virusa.
- Nosač RNA može se otopiti samo u puferu za eluciju (AVE); otopljeni nosač RNA treba odmah dodati u pufer za lizu (AL).
- Nosač RNA može biti uključen i u neke reagense za interne kontrole komercijalnih ispitivanja koja se primjenjuju u daljnjoj obradi. U tim slučajevima, pogledajte odgovarajuće upute za uporabu proizvođača ispitivanja koje se primjenjuje u daljnjoj obradi.

# Simboli

U uputama za uporabu ili na ambalaži i naljepnicama pojavljuju se sljedeći simboli:

Simbol	Definicija simbola
 <N>	Sadržava reagensa dovoljno za <N> reakcija
	Pročitajte upute za uporabu
	Upotrijebiti do
	Ovaj proizvod ispunjava zahtjeve Europske uredbe 2017/746 za in vitro dijagnostičke medicinske proizvode.
	In vitro dijagnostički medicinski proizvod
	Kataloški broj
	Važna napomena
	Broj serije
	Broj materijala (tj. oznaka komponente)
	Komponente
	Volumen
	Ograničenja temperature
	Proizvođač

## Simbol

## Definicija simbola



Pri dolasku



Otvorite nakon isporuke; čuvajte kolone QIAamp MinElute na 2 – 8 °C



Zabilježiti trenutačni datum nakon dodavanja etanola u bočicu

**ADD**

Dodavanje

**CONT**

Sadržava

**LYOPH**

Liofilizirano

**RCNS**

Rekonstituirajte u

**EtOH**

Etanol

**GuHCl**

Gvanidin hidroklorid

**MALEIC ACID**

Maleinska kiselina

**SUBT**

Subtilizin

**GTIN**

Globalni broj trgovačke jedinice



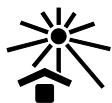
Vodi do

**NUM**

Broj

Rn

R se odnosi na reviziju uputa za uporabu, a n je broj revizije



Čuvajte podalje od sunčeve svjetlosti

## Simbol

## Definicija simbola

---



Upozorenje/oprez



Jedinstveni identifikator proizvoda

# Prilog

## Rukovanje s RNA

Ribonukleaze (RNaze) su vrlo stabilni i aktivni enzimi koji uglavnom ne trebaju kofaktore za funkcioniranje. Budući da se RNaze teško inaktiviraju, a za uništenje RNA su dovoljne su i minute, ne upotrebljavajte plastični ili stakleni pribor, a da pritom niste eliminirali moguću kontaminaciju RNazama. Treba obratiti pažnju na izbjegavanje nenamjernog uvođenja RNaza u uzorak RNA tijekom ili nakon postupka izolacije. Kako bi se stvorila i održala okolina bez RNaza, moraju se poduzeti sljedeće mjere opreza tijekom predobrade te uporabe jednokratnih i višekratnih posuda i otopina tijekom rada s RNA.

## Općenito rukovanje

Prilikom rada s RNA potrebno je uvijek upotrebljavati propisnu mikrobiološku i aseptičku tehniku. Ruke i čestice prašine mogu prenijeti bakterije i plijesni te su najčešći izvori kontaminacije RNazom. Uvijek nosite rukavice od lateksa ili vinila prilikom rukovanja reagensima i uzorcima RNA kako biste spriječili kontaminaciju RNazom s površine kože ili s prašnjave laboratorijske opreme. Često mijenjajte rukavice i držite epruvete zatvorenima.

# Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
QIAamp DSP Virus Spin Kit (50)	Za 50 pripremanja: kolone QIAamp MinElute, puferi, reagensi, epruvete, priključci VacConnectors	61704
<b>Povezani proizvodi</b>		
QIAcube Connect MDx*	Instrument i 1-godišnje jamstvo na dijelove i rad	9003070
<b>Dodatna oprema</b>		
Rotor Adapters	Za 240 pripremanja: 240 jednokratnih adaptera rotora i 240 epruveta za eluciju (1,5 ml); za uporabu s instrumentom QIAcube Connect MDx	990394
Rotor Adapter Holder	Držać za 12 jednokratnih adaptera rotora; za uporabu s instrumentom QIAcube Connect MDx	990392
Sample Tubes CB	1000 konusnih epruveta s navojnim čepovima bez ravnog dna (2 ml) za uporabu s instrumentom QIAcube Connect MDx	990382
Shaker Rack Plugs	Za punjenje nosača tresilice instrumenta QIAcube Connect MDx	9017854
Reagent Bottles, 30 ml	Bočice za reagense (30 ml) s poklopcima; paket od 6; za uporabu s instrumentom QIAcube Connect MDx	990393

Filter-Tips, 1000 µl	Jednokratni vršci s filtrom, na stalku; (8 x 128). Za uporabu s instrumentom QIAcube Connect MDx	990352
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore	Jednokratni vršci s filtrom, širokog promjera, na stalku; (8 x 128); nije potrebno za sve protokole. Za uporabu s instrumentom QIAcube Connect MDx	990452
Filter-Tips, 200 µl	Jednokratni vršci s filtrom, na stalku; (8 x 128). Za uporabu s instrumentima QIAcube Connect MDx i QIASymphony SP/AS	990332

\* Instrument QIAcube Connect MDx nije dostupan u svim zemljama. Za dodatne pojedinosti obratite se tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

Ažurirane informacije o licenciranju i izjave o odricanju odgovornosti specifične za proizvod potražite u odgovarajućim uputama za uporabu za QIAGEN komplet. Upute za uporabu za komplet QIAGEN dostupne su na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ili ih možete zatražiti od tehničke službe tvrtke QIAGEN ili svojeg lokalnog distributera.



# Povijest revizija dokumenta

## Revizija

## Opis

R1, lipanj 2022.

Inačica 2, revizija 1

- Ažuriranje inačice 2 kompleta radi usklađivanja s Uredbom o in vitro dijagnostičkim medicinskim proizvodima (IVDR)
- Ažuriranje odjeljaka Predviđena uporaba i Ograničenja
- Ažuriranje odjeljaka Opis i načelo
- Ažuriranje odjeljaka Isporučeni materijali (dodani su aktivni sastojci) i Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni
- Ažuriranje odjeljaka Upozorenja i mjere opreza (dodane su informacije za hitne slučajeve i odjeljak Odlaganje u otpad)
- Ažuriranje odjeljaka Pohrana i rukovanje reagensima
- Ažuriranje odjeljaka Prikupljanje, pohrana i rukovanje ispitcima
- Ažuriranje odjeljaka Važne napomene i Postupak
- Ažuriranje odjeljaka Radne značajke
- Ažuriranje odjeljaka Prilog
- Dodavanje Vodiča za rješavanje problema
- Ažuriranje odjeljaka Simboli
- Ažuriranje odjeljaka Informacije za naručivanje

Ova stranica namjerno je ostavljena praznom

Ova stranica namjerno je ostavljena praznom

### Ugovor o ograničenoj licenciji za komplet QIAamp® DSP Virus Spin Kit

Uporabom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik proizvoda pristaje na sljedeće uvjete:

1. Proizvod se smije upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim uputama za uporabu i namijenjen je samo za uporabu s komponentama koje su sadržane u panelu. Tvrtka QIAGEN ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za uporabu ili ugrađivanje komponentata ovog panela s bilo kojom komponentom koja nije uključena u ovaj panel, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, ovim uputama za uporabu i dodatnim protokolima dostupnima na stranici [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Neke od tih dodatnih protokola ustupili su korisnici tvrtke QIAGEN drugim korisnicima tvrtke QIAGEN. Tvrtka QIAGEN nije temeljito ispitala niti optimizirala te protokole. QIAGEN ne daje na njih nikakva jamstva niti jamči da ne krše prava trećih strana.
2. Osim izričito navedenih licencija, QIAGEN ne jamči da ovaj panel i/ili njegova uporaba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj panel i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, prerađivati niti preprodavati.
4. QIAGEN se odriče svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog panela potvrđuju da neće dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje. QIAGEN može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenciji na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenciji ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s panelom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Zaštitni znakovi: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAcube®, QIAamp® (grupacija QIAGEN). Registrirani nazivi, zaštitni znakovi itd. upotrijebljeni u ovom dokumentu, čak i ako nisu posebno označeni kao takvi, ne smiju se smatrati zakonski nezaštićenima.

1127542HR 06/2022 HB-3031-001 © 2022 QIAGEN, sva prava pridržana.

Narudžbe [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Tehnička podrška [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) |  
Web-mjesto [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)