

Istruzioni per l'uso (manuale) del QIAamp[®] DSP Virus Spin Kit



Versione 2

IVD

Per uso diagnostico in vitro

Per l'uso con QIAamp[®] DSP Virus Spin Kit

CE

REF

61704



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germania

R1 **MAT**

1127542IT

Indice

Uso previsto	4
Utente previsto	4
Descrizione e principio	5
Lisi con QIAGEN Protease (QP)	5
Assorbimento nella membrana QIAamp MinElute.....	5
Rimozione dei residui contaminanti	6
Eluizione di acidi nucleici di virali	6
Resa e qualità degli acidi nucleici virali	7
Aggiunta di controlli interni	8
Purificazione automatizzata degli acidi nucleici virali su QIAcube Connect MDx.....	8
Sommario e spiegazioni	11
Materiali in dotazione.....	12
Contenuto del kit.....	12
Componenti del kit	13
Materiali necessari ma non in dotazione	14
Reagenti aggiuntivi.....	14
Materiali di consumo	14
Strumentazione	14
Solo per la procedura automatizzata.....	14
Avvertenze e precauzioni	16
Informazioni sulla sicurezza.....	16
Informazioni di emergenza.....	17

Precauzioni	18
Smaltimento	19
Conservazione e manipolazione dei reagenti	20
Stabilità durante l'uso	20
Raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni	22
Note importanti	24
Punti importanti prima di iniziare	24
Manipolazione delle colonne QIAamp MinElute	25
Centrifugazione	25
Trattamento delle colonne QIAamp MinElute in una microcentrifuga	26
Preparazione di reagenti e tamponi	26
Protocollo: Purificazione degli acidi nucleici virali da plasma o siero con l'uso di una microcentrifuga o QIAcube Connect MDx	31
Controllo di qualità	35
Limitazioni	36
Caratteristiche delle prestazioni	37
Guida alla risoluzione dei problemi	38
Simboli	42
Appendice	45
Informazioni per gli ordini	46
Cronologia delle revisioni del documento	48

Uso previsto

Il QIAamp® DSP Virus Spin Kit è destinato all'isolamento e alla purificazione manuale o, se utilizzato in combinazione con lo strumento QIAcube® Connect MDx, all'isolamento e alla purificazione automatica di acidi nucleici virali provenienti da campioni di plasma e siero umani.

Il QIAamp DSP Virus Spin Kit utilizza la tecnologia su membrana di silice (tecnologia QIAamp) per l'isolamento e la purificazione di acidi nucleici virali di campioni di plasma e siero umani.

Questo prodotto è destinato all'uso diagnostico in vitro ed è rivolto a utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti in tecniche di biologia molecolare.

Utente previsto

Questo prodotto è destinato all'uso da parte di utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti nelle tecniche di biologia molecolare.

Descrizione e principio

La procedura QIAamp DSP Virus Spin prevede 4 fasi (lisi, legame, lavaggio ed eluizione) e viene eseguita con le colonne QIAamp MinElute® in una microcentrifuga standard QIAcube Connect MDx in modo automatizzato. La procedura è studiata per minimizzare il potenziale di contaminazione crociata tra campioni e permette di manipolare con sicurezza i campioni potenzialmente infettivi. La semplice procedura QIAamp DSP Virus Spin è indicata per processare simultaneamente più campioni. Il QIAamp DSP Virus Spin Kit può essere usato per isolare l'RNA e il DNA virali da un'ampia gamma di virus a RNA e DNA. Tuttavia non sono state accertate le caratteristiche delle prestazioni per ogni specie virale, pertanto l'utente le deve convalidare.

Lisi con QIAGEN Protease (QP)

I campioni vengono lisati in condizioni altamente denaturanti a temperature elevate. La lisi viene eseguita in presenza di QIAGEN Protease (QP) e di tampone di lisi (AL), che insieme assicurano l'inattivazione delle RNasi.

Assorbimento nella membrana QIAamp MinElute

Le condizioni di legame vengono regolate con aggiunta di etanolo per consentire un legame ottimale dell'RNA e del DNA virali alla membrana. Successivamente si trasferiscono i lisati a una colonna QIAamp MinElute e gli acidi nucleici virali, al passaggio del lisato, vengono assorbiti sulla membrana in gel di silice per effetto della centrifugazione. Il sale e le condizioni del pH garantiscono che le proteine e gli altri contaminanti, che possono inibire la PCR e altre reazioni enzimatiche a valle, non siano trattiene dalla membrana QIAamp MinElute.

Le provette di lavaggio da 2 ml (WT) (in dotazione) supportano la colonna QIAamp MinElute durante le fasi di caricamento e lavaggio.

Rimozione dei residui contaminanti

Gli acidi nucleici restano legati alla membrana, mentre i contaminanti vengono dilavati efficacemente durante le 3 fasi di lavaggio.

Eluizione di acidi nucleici di virali

In un unico passaggio, RNA e DNA virale altamente puri vengono eluiti dalla membrana della colonna QIAamp MinElute in tampone di eluizione (AVE), a temperatura ambiente. Le colonne QIAamp MinElute richiedono volumi di eluizione minimi di soli 20 µl nella procedura manuale e di 60 µl nella procedura automatizzata. Il basso volume di eluizione porta a eluiti altamente concentrati degli acidi nucleici.

Per applicazioni a valle che richiedano piccoli volumi iniziali (ad es. alcuni esami PCR e RT-PCR), una maggiore concentrazione dell'eluato può aumentare la sensibilità dell'esame.

Per le applicazioni downstream che richiedono un volume iniziale maggiore, il volume di eluizione può essere aumentato fino a 150 µl nella procedura manuale e fino a 100 µl nella procedura automatizzata. Un aumento del volume di eluizione diminuisce tuttavia la concentrazione degli acidi nucleici nell'eluato.

A causa del residuo di tampone di eluizione trattenuto dalla membrana della colonnina spin dopo la centrifugazione, il volume di eluito recuperato può essere inferiore al volume di tampone di eluizione applicato alla colonnina. Inoltre, il volume dell'eluato ottenuto dipende dalla natura del campione.

Gli acidi nucleici eluiti vengono raccolti in provette di eluizione da 1,5 ml (ET, in dotazione) e possono essere conservati a 2–8°C per un massimo di 24 ore. Per una conservazione a lungo termine che supera le 24 ore, si consiglia di mantenere gli acidi nucleici purificati ad una temperatura inferiore a 20°C.

Nota: la stabilità dell'eluato dipende in larga misura da vari fattori ed è correlata alla specifica applicazione downstream. È stata valutata per il QIAamp DSP Virus Spin Kit in combinazione con applicazioni downstream esemplari. È responsabilità dell'utente consultare le istruzioni per l'uso della specifica applicazione downstream utilizzata nel proprio laboratorio e/o convalidare l'intero flusso di lavoro per stabilire le condizioni di conservazione appropriate.

Resa e qualità degli acidi nucleici virali

Le rese di acido nucleico virale isolato da campioni biologici sono di norma inferiori a 1 µg. Per determinare la resa si raccomandano metodi di amplificazione quantitativa. Quando si quantificano gli acidi nucleici isolati con il protocollo QIAamp DSP Virus Spin, bisogna ricordare che nel campione sarà presente una quantità di RNA trasportatore molto superiore all'RNA virale.

L'RNA trasportatore svolge una duplice funzione. In primo luogo potenzia il legame degli acidi nucleici virali con la membrana QIAamp, soprattutto se il campione contiene un numero molto limitato di molecole target. Secondariamente, aggiungendo grandi quantità di RNA trasportatore si riduce la possibilità di degradazione dell'RNA virale, nel raro caso in cui le molecole delle RNasi non vengano denaturate dai sali caotropici e dal detergente nel tampone di lisi (AL). Se non si aggiunge RNA trasportatore al tampone di lisi (AL), si può osservare una diminuzione della quantità di DNA o RNA virale ottenuto.

Inoltre l'RNA trasportatore può rientrare nella composizione di alcuni reagenti per controllo interno degli esami downstream. In tali casi, consultare le istruzioni per l'uso fornite dal produttore degli esami downstream.

I diversi sistemi di amplificazione variano in termini di efficienza in funzione della quantità totale degli acidi nucleici presenti nella reazione. Gli eluati di questo kit contengono sia acidi nucleici virali sia RNA trasportatore, e il quantitativo di RNA trasportatore supera di gran lunga quello degli acidi nucleici virali. Il calcolo della quantità di eluito da aggiungere alle reazioni di amplificazione a valle dovrebbe essere dunque preso in considerazione

sulla quantità di RNA trasportatore aggiunta. Per ottenere il massimo livello di sensibilità nelle reazioni di amplificazione, potrebbe rendersi necessario regolare la quantità di soluzione di RNA trasportatore aggiunta al tampone di lisi (AL).

Aggiunta di controlli interni

L'uso del protocollo QIAamp DSP Virus Spin in combinazione con i sistemi di amplificazione disponibili sul mercato potrebbe richiedere l'introduzione di un controllo interno nella procedura di purificazione. L'RNA o il DNA di controllo interno dovrebbero essere aggiunti al tampone di lisi insieme all'RNA trasportatore. Per un'efficienza ottimale della purificazione, le molecole per controllo interno devono avere una lunghezza superiore a 200 nucleotidi, perché l'efficienza di recupero delle molecole più piccole è inferiore.

Consultare le istruzioni del produttore per stabilire la concentrazione ottimale. L'uso di una concentrazione diversa da quella raccomandata potrebbe ridurre l'efficacia dell'amplificazione.

Purificazione automatizzata degli acidi nucleici virali su QIAcube Connect MDx

QIAcube Connect MDx esegue l'isolamento e la purificazione automatizzati degli acidi nucleici. Può elaborare in continuo un massimo di 12 campioni per ciclo.

Se viene eseguita l'automazione del QIAamp DSP Virus Spin Kit sul QIAcube Connect MDx, lo strumento può processare non più di 50 campioni, a causa dei volumi morti, dell'evaporazione e dell'ulteriore consumo di reagenti da parte del prelievo automatizzato. Con l'uso manuale del QIAamp DSP Virus Spin Kit, QIAGEN garantisce soltanto 50 preparazioni di campioni.



Figura 1. QIAcube Connect MDx.

Procedura QIAamp DSP Virus Spin



Automatizzabile su QIAcube Connect MDx

Sommario e spiegazioni

Il QIAamp DSP Virus Spin Kit si avvale di una tecnologia consolidata per isolare e purificare simultaneamente il DNA e l'RNA virali. Il kit combina le proprietà di legame selettivo della membrana a base di silice nei confronti degli acidi nucleici con volumi di eluizione flessibili tra 20 e 150 µl nel flusso di lavoro manuale.

La procedura è idonea per plasma e siero; entrambi possono contenere citrato o EDTA. I campioni possono essere sia freschi che congelati, a condizione che non siano stati congelati e scongelati più di una volta.

La procedura può essere usata per isolare l'RNA e il DNA virali da una vasta gamma di RNA e DNA di virus. Le semplici procedure di centrifugazione del QIAamp DSP sono indicate per processare simultaneamente più campioni. La procedura può essere completamente automatizzata su QIAcube Connect MDx (pag. 9) per una maggiore standardizzazione e facilità d'uso con volumi di eluizione di 60–100 µl con incrementi di 5 µl. La procedura è studiata per evitare la contaminazione crociata tra campioni e consentire la manipolazione in sicurezza dei campioni potenzialmente infetti. Gli acidi nucleici virali vengono eluiti nel tampone di eluizione (AVE) e sono pronti per essere utilizzati in reazioni di amplificazione (PCR) o per la conservazione a -20°C per utilizzi successivi.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

Numero di catalogo
QIAamp DSP Virus Spin Kit

61704

Numero delle preparazioni

50[§]

QIAamp MinElute	QIAamp MinElute Column with Wash Tubes (colonne QIAamp MinElute con provette di lavaggio) (WT) (2 ml)		50
LT	Lysis Tubes (Provette di lisi) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (Provette di eluizione) (1,5 ml)		50
WT	Wash tube (Provetta di lavaggio) (WT) (2 ml)		5 x 50
AL	Lysis Buffer (Tampone di lisi)*		33 ml
AW1	Wash Buffer 1 (Tampone di lavaggio 1) (AW1)* (concentrato)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Tampone di lavaggio 2) (AW2) (concentrato)		13 ml
AVE	Elution Buffer (Tampone di eluizione)† (tappo viola)		4 x 2 ml
PS	Protease Solvent (Solvente della proteasi)†		4,4 ml
Carrier (Trasportatore)	Carrier RNA (RNA Trasportatore) (tappo rosso)		310 µg
QP	QIAGEN Protease (QIAGEN Proteasi) (QP)‡		1 fiala
–	Istruzioni per l'uso (manuale)		1

* Contiene un sale caotropico. Manipolare rispettando le misure di sicurezza e indossando guanti protettivi. Non compatibile con disinfettanti contenenti candeggina. Per maggiori informazioni, vedere pagina 16.

† Contiene azide di sodio come conservante.

‡ Vedere "Preparazione di reagenti e tamponi", pag. 26.

§ Se viene eseguita l'automazione del QIAamp DSP Virus Spin Kit sullo strumento QIAcube Connect MDx, quest'ultimo consente di processare non più di 50 campioni, a causa dei volumi morti, dell'evaporazione e dell'ulteriore consumo di reagenti da parte del pipettaggio automatizzato. Con l'uso manuale del QIAamp DSP Virus Spin Kit, QIAGEN garantisce soltanto 50 preparazioni di campioni.

Componenti del kit

I principali componenti del kit contenenti principi attivi sono illustrati di seguito.

Reagente	Principi attivi	Concentrazione (p/p) [%]
QIAGEN Protease (QP)	Subtilisina	da ≥ 90 a ≤ 100
AL	Guanidina cloridrato Acido maleico	da ≥ 30 a < 50 da $\geq 0,1$ a < 1
AW1	Guanidina cloridrato	da ≥ 50 a < 70

Materiali necessari ma non in dotazione

Reagenti aggiuntivi

- Etanolo (96–100%)*

Materiali di consumo

- Pipette† e relativi puntali (per evitare la contaminazione crociata, si raccomanda vivamente di utilizzare puntali con barriere anti-aerosol)
- Guanti monouso

Strumentazione

- Blocco riscaldante† per la lisi dei campioni a 56°C
- Microcentrifuga† (con rotore per provette da 1,5 ml e 2 ml)
- Cilindro graduato (50 ml)
- Agitatore Vortex
- Per campioni <200 µl: Soluzione NaCl allo 0,9%

Solo per la procedura automatizzata

- QIAcube Connect MDx† (n. cat. 9003070)
- Rotor Adapter (n. cat. 990394)
- Rotor Adapter Holder (n. cat. 990392)
- Sample Tubes CB (2 ml, n. cat. 990382, provetta di ingresso campione)
- Shaker Rack Plugs (n. cat. 9017854)
- Reagent Bottles, 30 ml, (n. cat. 990393)

* Non utilizzare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone.

† Prima dell'uso, assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

- Filter-Tips, 1000 μ l (n. cat. 990352)
- Filter-Tips, 1000 μ l, wide-bore, (n. cat. 990452)
- Filter-Tips, 200 μ l (n. cat. 990332)
- SafeSeal Tube, 1,5 ml, Sarstedt® (n. cat. 72.706)

Avvertenze e precauzioni

Tenere presente che potrebbe essere richiesto di consultare le norme locali per la segnalazione al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità di regolamentazione del Paese dell'utente e/o del paziente di gravi incidenti verificatisi in relazione al dispositivo.

Per uso diagnostico in vitro.

Leggere attentamente tutte le istruzioni prima di utilizzare il kit.

Informazioni sulla sicurezza

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.



CAUTELA: NON aggiungere candeggina o soluzioni acide direttamente alle sostanze di scarto della preparazione dei campioni.

- Il tampone di lisi (AL) e il tampone di lavaggio 1 (AW1) contengono guanidina cloridrato, che può formare composti altamente reattivi in combinazione con la candeggina. Se si rovescia il liquido di questi tamponi, pulire con acqua e detergente da laboratorio idoneo. Se il liquido rovesciato contiene agenti potenzialmente infetti, pulire l'area interessata, prima con acqua e detergente da laboratorio, e successivamente con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% (v/v).

- Se i flaconi di tampone sono danneggiati o si riscontrano perdite, indossare guanti e occhiali di protezione al momento del loro smaltimento, onde evitare lesioni personali a sé o ad altri.
- QIAGEN non ha testato i liquidi di scarico generati dalla procedura QIAamp DSP Virus Spin per la presenza di materiali residui infetti. La contaminazione dei liquidi di scarico da parte di materiali infetti residui è altamente improbabile, ma non può essere esclusa completamente. Pertanto, i liquidi di scarico devono essere considerati infetti e smaltiti in conformità alle normative di sicurezza locali.
- I campioni sono potenzialmente infettivi. Smaltire campioni e materiali di scarto dell'esame nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.

Informazioni di emergenza

CHEMTREC

USA e Canada 1-800-424-9300

Al di fuori di USA e Canada +1 703-527-3887

Precauzioni

Al QIAamp DSP Virus Spin Kit sono associate le seguenti informazioni su rischi e misure precauzionali:

Lysis Buffer (AL)



Contiene: guanidina cloridrato; acido maleico. Avvertenza! Può essere nocivo se ingerito o inalato. Causa irritazione cutanea. Può provocare una reazione allergica cutanea. Causa grave irritazione agli occhi. Indossare guanti/abbigliamento protettivo/protezione per gli occhi/la faccia. In caso di malore, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti.

Wash Buffer 1 (AW1)



Contiene guanidina cloridrato. Avvertenza! Nocivo se ingerito o inalato. Causa irritazione cutanea. Causa grave irritazione agli occhi. Indossare guanti/abbigliamento protettivo/protezione per gli occhi/la faccia. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti.

QIAGEN Protease (QP)



Contiene: subtilisina. Pericolo! Nocivo se ingerito. Causa irritazione cutanea. Causa grave danno oculare. Se inalato, può causare sintomi di asma e allergia o difficoltà respiratorie. Può essere irritante per le vie respiratorie. Evitare di respirare le polveri/i fumi/i gas/il prodotto nebulizzato/i vapori/gli aerosol. Indossare guanti/abbigliamento protettivo/protezione per gli occhi/la faccia. Indossare una protezione per la respirazione. **IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI:** sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. **IN CASO DI esposizione o di possibile esposizione:** Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Portare la persona all'aria aperta e mantenerla tranquilla in posizione confortevole per la respirazione.

Smaltimento

I materiali di scarto contengono campioni e reagenti. Tali materiali di scarto possono contenere materiali tossici o infettivi, pertanto devono essere opportunamente smaltiti. Consultare le normative di sicurezza locali per le corrette procedure di smaltimento.

Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede SDS in formato PDF sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile reperire, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Prestare attenzione alle date di scadenza e alle condizioni di conservazione stampate sulla confezione e sulle etichette di tutti i componenti. Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.

Conservare le colonne QIAamp MinElute a 2–8°C dopo la consegna del kit. Se conservate correttamente, le colonne QIAamp MinElute sono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla rispettiva scatola.

Nota: per garantire che i componenti del kit non vengano mescolati, etichettare le colonne QIAamp MinElute con il rispettivo numero di lotto del kit.

Tutti i tamponi possono essere conservati a temperatura ambiente (15–25°C) fino alla data di scadenza indicata sulla scatola del kit.

L'RNA trasportatore liofilizzato può essere conservato a temperatura ambiente fino alla data di scadenza indicata sulla scatola del kit.

La QIAGEN Protease (QP) liofilizzata può essere conservata a temperatura ambiente fino alla data di scadenza del kit, senza alcuna perdita di prestazioni.

Stabilità durante l'uso

L'RNA trasportatore può essere disciolto soltanto nel tampone di eluizione (AVE); l'RNA trasportatore disciolto deve essere aggiunto immediatamente al tampone di lisi (AL), come descritto a pagina 27. Questa soluzione deve essere preparata al momento e rimane stabile max. 48 ore se conservata a 2–8°C. Le porzioni inutilizzate di RNA trasportatore disciolto nel tampone di eluizione (AVE) devono essere congelate in aliquote a -20°C.

La QIAGEN Protease (QP) ricostituita in solvente per proteasi (PS) è stabile fino a un anno se conservata a 2–8°C, ma solo fino alla data di scadenza del kit. Evitare di tenere a temperatura ambiente per lunghi periodi la soluzione madre di QIAGEN Protease (QP).

Il tampone di lavaggio 1 (AW1) ricostituito e il tampone di lavaggio 2 (AW2) ricostituito sono stabili per un anno se conservati a temperatura ambiente ma solo fino alla data di scadenza indicata sulla scatola del kit. Per la preparazione dei tamponi per la procedura automatizzata, seguire le istruzioni del *Manuale utente di QIAcube Connect MDx*.

Raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni

Nota: la stabilità del campione dipende in larga misura da vari fattori ed è correlata alla specifica applicazione downstream. È stata valutata in combinazione con applicazioni downstream esemplari. È responsabilità dell'utente consultare le istruzioni per l'uso della specifica applicazione downstream utilizzata nel proprio laboratorio e/o convalidare l'intero flusso di lavoro per stabilire le condizioni di conservazione appropriate.

Per suggerimenti generali sulla raccolta, il trasporto e la conservazione, consultare la linea guida approvata dal CLSI MM13-A "Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods". Inoltre, durante la preparazione, la conservazione, il trasporto e la manipolazione dei campioni in generale, devono essere seguite le istruzioni del produttore del dispositivo di raccolta dei campioni selezionato.

La procedura di purificazione è ottimale per l'uso con campioni di plasma e siero umani. È possibile utilizzare campioni di sangue trattati con EDTA oppure citrato come anticoagulante per la preparazione del plasma. I campioni possono essere sia freschi che congelati, a condizione che non siano stati congelati e scongelati più di una volta. Scongela i campioni con una leggera agitazione per garantirne un'accurata miscelazione.

Dopo il prelievo e la centrifugazione, è possibile conservare plasma e siero a 2–8°C per un massimo di 6 ore. Per una conservazione a lungo termine, è consigliato il congelamento a una temperatura compresa tra -20°C e -80°C in aliquote. I campioni di siero e plasma non devono essere scongelati più di una volta. Il congelamento–decongelamento ripetuto causa la denaturazione e la precipitazione delle proteine, con la conseguente riduzione dei titoli virali e quindi delle rese di acidi nucleici virali. Inoltre, i crioprecipitati che si formano durante il congelamento e lo scongelamento ripetuti ostruiscono la membrana QIAamp MinElute. Se sono visibili crioprecipitati, farli sedimentare per centrifugazione a circa 6800 x g per 3 minuti. Aspirare e processare immediatamente il supernatante emerso, senza toccare il sedimento. Avviare immediatamente il processo di purificazione. La centrifugazione a basse forze-g non causa la riduzione dei titoli virali.

Nota: secondo studi di interferenza esemplari per il QIAamp DSP Virus Spin Kit e in linea con la norma ISO 20186-2:2019(E), l'eparina presente nelle provette di raccolta del sangue può influire sulla purezza degli acidi nucleici isolati e il possibile carryover negli eluiti può causare inibizioni in alcune applicazioni downstream. Pertanto, si consiglia di utilizzare campioni di sangue trattati con EDTA o citrato come anticoagulante.

Note importanti

Punti importanti prima di iniziare

- Dopo la ricezione, verificare che i componenti del kit non siano danneggiati. Se le confezioni blister o i flaconi di tampone appaiono danneggiati, rivolgersi ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale. In caso di fuoriuscita di liquidi, fare riferimento a “Avvertenze e precauzioni” (pag. 16). Non utilizzare componenti del kit danneggiati, poiché potrebbero limitare il rendimento del kit.
- Utilizzare sempre attrezzature esenti da RNasi.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali per pipetta. Per limitare al minimo il rischio di contaminazione crociata, si consiglia di utilizzare puntali per pipette con barriera aerosol anticontaminazione.
- Utilizzare sempre guanti monouso e controllare regolarmente che non siano contaminati con materiale dei campioni. Se i guanti risultano contaminati, eliminarli.
- Per limitare al minimo il rischio di contaminazione crociata, aprire soltanto una provetta per volta.
- Dopo tutte le fasi di centrifugazione con vortex a pulsazione, centrifugare brevemente le provette per microcentrifuga per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.
- Tutte le fasi di centrifugazione hanno luogo a temperatura ambiente (15–25°C).
- L'utente deve prestare attenzione a mantenere sempre la tracciabilità dei campioni durante l'intero processo.
- Non utilizzare contemporaneamente componenti di più kit per la stessa procedura, a meno che i numeri di lotto non siano identici.
- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti del kit.
- Per ridurre al minimo il rischio di infezione dovuto a materiale potenzialmente infetto, si raccomanda di operare in condizioni di flusso d'aria laminare finché non ha avuto luogo la lisi dei campioni.
- Per l'automazione, seguire le istruzioni dell'interfaccia utente (QIAcube Connect MDx) e fare riferimento al manuale utente pertinente (per QIAcube Connect MDx).

- Il kit deve essere utilizzato esclusivamente da personale esperto nelle pratiche di laboratorio per la diagnostica in vitro.

Manipolazione delle colonne QIAamp MinElute

A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, per la manipolazione delle colonne QIAamp MinElute occorre osservare le seguenti precauzioni per evitare la contaminazione crociata tra le preparazioni dei campioni:

- Applicare con cura il campione o la soluzione alla colonna QIAamp MinElute. Pipettare il campione nella colonna QIAamp MinElute senza bagnare il bordo della colonna.
- Tra un trasferimento e l'altro di liquidi, sostituire sempre i puntali delle pipette. Si consiglia vivamente l'uso di puntali per pipetta con barriera aerosol anticontaminazione.
- Evitare di toccare la membrana QIAamp MinElute con il puntale per pipetta.
- Aprire una sola colonna QIAamp MinElute per volta, facendo attenzione a non generare aerosol.

Centrifugazione

- Le provette per lavaggio (WT) e per eluizione per tutte le fasi di centrifugazione sono in dotazione al kit.
- La centrifugazione delle colonne QIAamp MinElute viene eseguita a circa 6000 x g per ridurre il disturbo. La centrifugazione delle colonne QIAamp MinElute alla massima velocità non influisce sulla resa di DNA o RNA.
- La centrifugazione alla fine della procedura di lavaggio e per l'eluizione dovrebbe invece essere eseguita alla massima velocità.
- Tutte le fasi di centrifugazione devono essere effettuate a temperatura ambiente (15–25°C).

Trattamento delle colonne QIAamp MinElute in una microcentrifuga

- Chiudere la colonna QIAamp MinElute prima di collocarla nella microcentrifuga. Centrifugare come descritto.
- Rimuovere la colonna QIAamp MinElute e la provetta di lavaggio (WT) dalla microcentrifuga.
- Inserire la colonna QIAamp MinElute in una nuova provetta di lavaggio (WT). Gettare il filtrato e la provetta di lavaggio (WT). Attenzione: il filtrato può contenere rifiuti pericolosi e deve essere smaltito secondo corrette procedure.
- Aprire una sola colonna QIAamp MinElute per volta, facendo attenzione a non generare aerosol.

Per un efficiente trattamento parallelo di più campioni, si consiglia di riempire un rack con provette di lavaggio (WT) in modo da potervi trasferire le colonne QIAamp MinElute dopo la centrifugazione. Le provette di lavaggio (WT) usate contenenti il filtrato possono essere gettate e le nuove, contenenti le colonne QIAamp MinElute, collocate direttamente nella microcentrifuga.

Preparazione di reagenti e tamponi

Preparazione dell'RNA

Quando si prepara l'RNA virale, operare rapidamente durante le fasi manuali della procedura e leggere l'Appendice a pag. 45 prima di iniziare.

Preparazione della QIAGEN Protease (QP)

Aggiungere l'intero contenuto della fiala di solvente della proteasi (PS), ovvero 4,4 ml, alla provetta contenente la QIAGEN Protease (QP) liofilizzata e miscelare con cura. Per evitare la formazione di schiuma, miscelare capovolgendo la fiala diverse volte. Assicurarsi che la QIAGEN Protease (QP) sia completamente disciolta.



Non aggiungere la QIAGEN Protease (QP) direttamente al tampone di lisi (AL).*

Aggiunta di RNA trasportatore e controllo interno al tampone di lisi (AL)* (solo per la procedura manuale)

Si raccomanda fortemente l'impiego di un controllo interno quando si utilizza QIAamp DSP Virus Spin Kit in combinazione con sistemi di amplificazione diagnostici. Per ulteriori informazioni, vedere le istruzioni fornite dal produttore. In questo caso occorre aggiungere al tampone di lisi (AL) controllo interno e RNA trasportatore ricostituito, quindi miscelarli delicatamente, capovolgendo la provetta 10 volte. Per evitare la formazione di schiuma, non utilizzare il vortex. Se si utilizza un controllo interno, ridurre di conseguenza il volume del tampone di lisi (AL) (per ulteriori dettagli, vedere la Tabella 1).

Consultare le istruzioni del produttore per stabilire la concentrazione ottimale del controllo interno. L'uso di una concentrazione diversa da quella consigliata può generare risultati scorretti. Quando si calcola la quantità appropriata di controllo interno da utilizzare, tenere in considerazione il volume iniziale del campione e quello di eluizione. Occorre ricordare che il QIAamp DSP Virus Spin Kit impiega un volume di campione iniziale pari a 200 µl.

Per preparare la soluzione di RNA trasportatore, aggiungere 310 µl di tampone di eluizione (AVE) alla provetta contenente 310 µg di RNA trasportatore liofilizzato, ottenendo quindi una soluzione di 1 µg/µl. Disciogliere completamente l'RNA trasportatore, suddividerlo in aliquote di dimensioni opportune e conservarlo a una temperatura di -20°C. Non congelare e scongelare le aliquote di RNA trasportatore più di 3 volte.

* Contiene sale caotropico. Adottare adeguate misure di sicurezza da laboratorio e indossare guanti durante la manipolazione. Non compatibile con disinfettanti contenenti candeggina. Per le informazioni sulla sicurezza, consultare pag. 16.

 L'RNA trasportatore non si discioglie nel tampone di lisi (AL). È prima necessario discioglierlo nel tampone di eluizione (AVE) e successivamente aggiungerlo al tampone di lisi (AL). Assicurarsi che l'RNA trasportatore sia completamente disciolto nel volume appropriato di tampone di eluizione (AVE), prima di miscelarlo con il tampone di lisi (AL).

Calcolare il volume della miscela tampone di lisi (AL)/RNA trasportatore per gruppo di campioni, selezionando nella Tabella 1 a pag. 29 il numero di campioni da elaborare contemporaneamente. Per un maggior numero di campioni, si possono calcolare i volumi usando il calcolo dei campioni indicato di seguito.

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

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

dove: n = numero di campioni da elaborare simultaneamente

y = volume calcolato del tampone di lisi (AL)

z = volume di RNA trasportatore–tampone di eluizione (AVE) da aggiungere al tampone di lisi (AL)

Miscelare delicatamente la provetta capovolgendola 10 volte. Per evitare la formazione di schiuma, non utilizzare il vortex.

Tabella 1. Volumi (Vol.) di tampone di lisi (AL) e miscela di RNA trasportatore-tampone di eluizione (AVE) necessari per un numero specifico (N.) di campioni per la procedura QIAamp DSP Virus Spin*

N. campioni	Vol. tampone di lisi (AL) *(ml)	Vol. RNA trasportatore - AVE (µl)	N. campioni	Vol. tampone di lisi (AL) *(ml)	Vol. RNA trasportatore - 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



La procedura di preparazione dei campioni è ottimale per 5,6 µg di RNA trasportatore per campione. Se una minore quantità di RNA trasportatore dimostra di essere più indicata per un determinato sistema di amplificazione, trasferire solo la quantità necessaria di RNA trasportatore disciolta nelle provette contenenti tampone di lisi (AL). Per ogni microgrammo di RNA trasportatore necessario per ogni preparazione, aggiungere 5 µl di RNA trasportatore disciolto in tampone di eluizione (AVE) per ogni millilitro di tampone di lisi (AL). L'uso di meno di 5,6 µg di RNA trasportatore per campione deve essere convalidato per ogni particolare tipo di campione e di esame downstream.

*Se si utilizza un controllo interno, ridurre di conseguenza il volume del tampone di lisi (AL).

Per la procedura automatizzata, preparare l'RNA trasportatore in AVE come descritto in precedenza (per ottenere una soluzione di 1 µg/µl). Nella fase successiva, fornire al QIAcube Connect MDx una quantità di soluzione di RNA trasportatore sufficiente per il numero di campioni richiesto più due campioni aggiuntivi. La quantità necessaria viene visualizzata sull'interfaccia utente durante il caricamento. Per la l'aggiunta dell'RNA trasportatore tampone di lisi (AL) viene effettuata dal QIAcube Connect MDx.

La miscela di controllo interno viene preparata come descritto nella schermata dello strumento QIAcube MDx. Il controllo interno viene aggiunto alla miscela RNA trasportatore-AVE.

Preparazione del tampone di lavaggio 1 (AW1)*

Con un cilindro graduato, aggiungere 25 ml di etanolo (96–100%) a un flacone contenente 19 ml di tampone di lavaggio 1 (AW1) concentrato, come descritto sul flacone. Spuntare la casella sull'etichetta per indicare che è stato aggiunto etanolo. Conservare il tampone di lavaggio 1 (AW1) ricostituito a temperatura ambiente.

 Miscelare sempre il tampone di lavaggio 1 (AW1) ricostituito, capovolgendo il flacone più volte prima di iniziare la procedura.

Preparazione del tampone di lavaggio 2 (AW2)†

Con un cilindro graduato, aggiungere 30 ml di etanolo (96–100%) a un flacone contenente 13 ml di tampone di lavaggio 2 (AW2) concentrato, come descritto sul flacone. Spuntare la casella sull'etichetta per indicare che è stato aggiunto etanolo. Conservare il tampone di lavaggio 2 (AW2) ricostituito a temperatura ambiente.

 Miscelare sempre il tampone di lavaggio 2 (AW2) ricostituito, capovolgendo il flacone più volte prima di iniziare la procedura.

Preparazione del tampone di eluizione (AVE)

Il kit comprende quattro provette di tampone di eluizione (AVE). Fare attenzione a non contaminare il tampone con RNasi. Se si eseguono 4 procedure di purificazione, o meno, con un solo kit, si consiglia di eliminare la provetta del tampone di eluizione (AVE) al termine di ciascuna procedura.

* Contiene sale caotropico. Adottare adeguate misure di sicurezza da laboratorio e indossare guanti durante la manipolazione. Non compatibile con disinfettanti contenenti candeggina. Per le informazioni sulla sicurezza, consultare pag. 16.

† Contiene azide di sodio come conservante.

Protocollo: Purificazione degli acidi nucleici virali da plasma o siero con l'uso di una microcentrifuga o QIAcube Connect MDx

Per la purificazione degli acidi nucleici virali di 200 µl di plasma o siero trattato con EDTA o citrato, utilizzando il QIAamp DSP Virus Spin Kit in microcentrifuga o in modo automatizzato con il QIAcube Connect MDx.

Punti importanti prima di iniziare

- La seguente procedura fornisce istruzioni per elaborare un singolo campione. È tuttavia possibile elaborare vari campioni simultaneamente; il numero dipende dalla capacità della microcentrifuga impiegata.
- L'elaborazione automatica di 2–10 o 12 campioni può essere eseguita sul QIAcube Connect MDx.
- Per l'automazione, seguire le istruzioni dell'interfaccia utente (QIAcube Connect MDx) e consultare il manuale utente di QIAcube Connect MDx.

Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Lasciar equilibrare i campioni a temperatura ambiente (15–25°C) e assicurarsi che siano adeguatamente miscelati.
- Assicurarsi che tutti i reagenti e le colonne QIAamp MinElute (in blister chiusi) siano stabilizzati a temperatura ambiente.
- Impostare un blocco riscaldante a 56°C da utilizzare nella fase 4 (necessario per la procedura manuale e per la procedura automatizzata con lisi manuale off-board).
- Assicurarsi che il tampone di lavaggio 1 (AW1), il tampone di lavaggio 2 (AW2) e la QIAGEN Protease (QP) siano stati preparati secondo le istruzioni riportate alle pagine 26–30.

- Se si è formato un precipitato nel tampone di lisi (AL), scioglierlo con un'incubazione a 56°C.
- Aggiungere l'RNA trasportatore ricostituito nel tampone di eluizione (AVE) al tampone di lisi (AL), seguendo le istruzioni a pag. 27 (solo per la procedura manuale).
- Se possibile, usare tampone di eluizione (AVE) appena preparato per ogni procedura (sono fornite 4 provette).
- Le procedure di controllo qualità di QIAGEN comprendono l'esecuzione di test funzionali per il rilascio dei kit condotti sui singoli lotti di kit. Pertanto, non miscelare reagenti appartenenti a lotti di kit diversi e non unire singoli reagenti provenienti da lotti di reagenti diversi.

Procedura

- Per la procedura manuale con una microcentrifuga, seguire i passaggi 1–15.
- Questa procedura può essere automatizzata su QIAcube Connect MDx in due diverse versioni:
 - Plasma or Serum_Standard (Plasma o Siero_Standard): Automazione completa con 200 µl di campione (automazione a partire dal passaggio 1)
 - Plasma or Serum_Manual lysis (Plasma o Siero_Lisi manuale): Automazione parziale con lisi off-board manuale utilizzando 200 µl di volume di campione iniziale (automazione a partire dal passaggio 5)

1. Pipettare 25 µl di QIAGEN Protease (QP) in una provetta di lisi (LT).



Prima dell'uso, controllare la data di scadenza della proteasi ricostituita.

2. Aggiungere 200 µl di plasma o siero alla provetta di lisi (LT).

Nota: se il volume del campione è inferiore a 200 µl, aggiungere il volume appropriato di soluzione di cloruro di sodio 0,9% per ottenere un volume totale di proteasi e campione di 225 µl.

3. Aggiungere 200 µl di tampone di lisi (AL) (contenente 28 µg/ml di RNA trasportatore e, eventualmente, il controllo interno). Chiudere il tappo e miscelare in vortex a pulsazione per ≥15 secondi.

Per assicurare una lisi efficace, è essenziale miscelare con cura il campione e il tampone di lisi (AL), in modo da ottenere una soluzione omogenea.

 Il tampone di lisi (AL) comprende un controllo interno. Poiché il tampone di lisi (AL) presenta un'elevata viscosità, assicurarsi di aggiungerne il volume appropriato pipettando accuratamente.

 Non aggiungere la QIAGEN Protease (QP) direttamente al tampone di lisi (AL).

4. Incubare a 56°C per 15 minuti in un blocco riscaldante.
5. Centrifugare brevemente la provetta di lisi (LT) per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.

Nota: se la lisi manuale (passaggi 1–15) è stata effettuata off-board, è possibile automatizzare i seguenti passaggi (6–15): “Protocollo di lisi manuale” su QIAcube Connect MDx.

6. Aggiungere 250 µl di etanolo (96–100%) al campione, chiudere il tappo e miscelare accuratamente con il vortex a pulsazione per ≥15 secondi. Incubare il lisato con l'etanolo per 5 min secondi a temperatura ambiente (15–25°C).
7. Centrifugare brevemente la provetta per eliminare le gocce dall'interno del tappo.
8. Applicare attentamente tutto il lisato ottenuto nella fase 7 alla colonna QIAamp MinElute senza bagnare il bordo. Chiudere il tappo e centrifugare a circa 6000 x g per un tempo >1 min. Collocare la colonna QIAamp MinElute in una provetta di lavaggio pulita da 2 ml (WT) e gettare la provetta di lavaggio contenente il filtrato.

 Se il lisato non è ancora passato tutto attraverso la colonna dopo la centrifugazione, centrifugare di nuovo a velocità più elevata fino a che la colonna QIAamp MinElute non è vuota.

9. Aprire con cautela la colonna QIAamp MinElute e aggiungere 500 µl di tampone di lavaggio 1 (AW1) senza bagnare il bordo. Chiudere il tappo e centrifugare a circa 6000 x g per un tempo ≥ 1 min. Collocare la colonna QIAamp MinElute in una provetta di lavaggio pulita da 2 ml (WT) e gettare la provetta di lavaggio contenente il filtrato.
10. Aprire con cautela la colonna QIAamp MinElute e aggiungere 500 µl di tampone di lavaggio 2 (AW2) senza bagnare il bordo. Chiudere il tappo e centrifugare a circa 6000 x g per un tempo > 1 min. Collocare la colonna QIAamp MinElute in una provetta di lavaggio pulita da 2 ml (WT) e gettare la provetta di lavaggio contenente il filtrato.
11. Aprire con cautela la colonna QIAamp MinElute e aggiungere 500 µl di etanolo (96–100%) senza bagnare il bordo. Chiudere il tappo e centrifugare a circa 6000 x g per > 1 min. Gettare la provetta di lavaggio (WT) contenente il filtrato.



Il carryover di etanolo nell'eluito può causare problemi nelle applicazioni a valle. Alcuni rotori di centrifuga possono vibrare in fase di decelerazione, facendo sì che il flow-through, contenente etanolo, venga a contatto con la colonna QIAamp MinElute. Anche quando si rimuovono la colonna QIAamp MinElute e la provetta di lavaggio (WT) del rotore può succedere che il flow-through venga a contatto con la colonna QIAamp MinElute.

12. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una provetta di lavaggio (WT) pulita da 2 ml. Centrifugare alla massima velocità (circa 20.000 x g) per 3 minuti secondi per asciugare completamente la membrana.



Se la membrana non viene asciugata per centrifugazione, potrebbe risultare impossibile eseguire il test successivo.

13. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una nuova provetta di lavaggio (WT) da 2 ml, aprire il tappo e incubare il tutto a 56°C per 3 minuti secondi per asciugare completamente la membrana e far evaporare il liquido rimanente.
14. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una provetta per eluizione (ET) e gettare la provetta di lavaggio (WT) con il filtrato. Aprire con cautela il tappo della colonna QIAamp MinElute e aggiungere 20–150 µl di tampone di eluizione (AVE) nel centro della membrana.

 È importante utilizzare una nuova provetta di eluizione per evitare la contaminazione con i tamponi di lavaggio residui che potrebbero causare l'inibizione degli esami downstream.

 La dispensazione del tampone di eluizione al centro della membrana è particolarmente importante per i volumi di eluizione più piccoli, per garantire un recupero ottimale degli acidi nucleici e del tampone di eluizione.

 Il volume di eluizione può essere adattato alle esigenze dell'applicazione downstream. Nel flusso di lavoro automatizzato sono possibili volumi di eluizione di 60–100 µl con aumenti di 5 µl. Ricordare che il volume dell'eluato recuperato può essere inferiore al volume del tampone di eluizione applicato alla colonna a causa del tampone di eluizione rimanente trattenuto dalla membrana della colonnina spin dopo la centrifugazione.

 Accertarsi che il tampone di eluizione sia stabilizzato a temperatura ambiente.

15. Chiudere il tappo e incubare a temperatura ambiente per ≥ 3 min. Centrifugare alla massima velocità (circa 20.000 x g) per 1 min.

 Orientare i coperchi delle provette di eluizione in modo che siano rivolti nel senso opposto alla rotazione del rotore (ad es., se il rotore ruota in senso orario, orientare i coperchi in senso antiorario).

 Nel caso in cui tutte le procedure siano automatizzate, rimuovere gli eluiti dallo strumento direttamente dopo la fine del processo e conservarli correttamente.

Controllo di qualità

In conformità con il Sistema di Gestione della Qualità certificato ISO di QIAGEN, ogni lotto di QIAamp DSP Virus Spin Kit è stato testato in base a specifiche predefinite per garantire la costante qualità del prodotto.

Limitazioni

Le prestazioni del sistema sono state dimostrate in studi di valutazione delle prestazioni per la purificazione di acidi nucleici virali provenienti da campioni di plasma e siero umani.

È responsabilità dell'utente verificare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia stata già oggetto di uno studio di valutazione delle prestazioni da parte di QIAGEN.

Per minimizzare il rischio di un impatto negativo sui risultati diagnostici, è necessario ricorrere ad adeguati controlli delle applicazioni a valle. Eventuali risultati diagnostici generati dal sistema devono essere interpretati in combinazione con gli esiti di altri esami clinici o di laboratorio.

Caratteristiche delle prestazioni

Le caratteristiche delle prestazioni applicabili sono disponibili nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo www.qiagen.com.

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti dei Servizi tecnici QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e/o protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni ed esami (per i dati di contatto visitare il sito www.qiagen.com).

Commenti e suggerimenti

Raccomandazioni generali per il trattamento

- a) Ostruzione dei puntali delle pipette durante il trasferimento dei campioni
- Campioni congelati non miscelati correttamente dopo lo scongelamento. Scongelerare i campioni con una leggera agitazione per garantirne un'accurata miscelazione.
- Crioprecipitati che si formano durante il congelamento e lo scongelamento ripetuti ostruiscono la membrana QIAamp MinElute. Nel caso in cui siano visibili crioprecipitati, eliminare il campione mediante centrifugazione per 5 minuti a 16.000 x g.
- b) Colonne QIAamp MinElute ostruite
- Se il lisato non è passato completamente attraverso la membrana dopo la centrifugazione a 6.000 x g (8.000 rpm), centrifugare di nuovo alla velocità massima (fino a 20.800 x g) per 1 min.
- Se il lisato continua a non passare attraverso la membrana durante la centrifugazione, eliminare il campione e ripetere l'isolamento e la purificazione con nuovi campioni iniziando dal passaggio 1.
- Crioprecipitati che si formano durante il congelamento e lo scongelamento ripetuti ostruiscono la membrana della colonna QIAamp MinElute. Nel caso in cui siano visibili crioprecipitati, eliminare il campione mediante centrifugazione per 5 minuti a 16.000 x g. L'uso di etanolo raffreddato con ghiaccio durante la lisi può contribuire a ridurre il rischio di ostruzione della membrana. Inoltre, è essenziale aggiungere i tamponi per la lisi nell'ordine corretto descritto sopra. Non aggiungere la QIAGEN Protease (QP) direttamente al tampone di lisi (AL).

Commenti e suggerimenti

- c) Formazione di precipitato nel tampone di lisi Sciogliere mediante incubazione del tampone di lisi (AL) a 56°C.
- d) Volumi di eluizione variabili Il volume dell'eluato ottenuto dipende dalla natura del campione. A causa del residuo di tampone di eluizione trattenuto dalla membrana della colonna spin dopo la centrifugazione, il volume di eluito recuperato può essere inferiore al volume di tampone di eluizione applicato alla colonna. Applicare il tampone di eluizione al centro della membrana. La dispensazione del tampone di eluizione al centro della membrana è particolarmente importante per i volumi di eluizione più piccoli, per garantire un recupero ottimale degli acidi nucleici e del tampone di eluizione.
- e) Per problemi nel flusso di lavoro automatizzato Consultare il *Manuale utente di QIAcube Connect MDx*.

Prestazioni del DNA insoddisfacenti nelle applicazioni downstream

- a) Lisi dei campioni incompleta Se la QIAGEN Protease (QP) è stata sottoposta a temperature elevate per un tempo prolungato, può ridurre la sua capacità d'azione. Ripetere la procedura utilizzando nuovi campioni e QIAGEN Protease (QP) fresca.
- Assicurarsi di sciogliere la QIAGEN Protease (QP) con il solvente per proteasi secondo le istruzioni sopra riportate. Per evitare la formazione di schiuma, miscelare capovolgendo la fiala diverse volte. Assicurarsi che la QIAGEN Protease (QP) sia completamente disciolta. Non aggiungere la QIAGEN Protease (QP) direttamente al tampone di lisi (AL).
- Per assicurare una lisi efficace, è essenziale miscelare con cura il campione e il tampone di lisi (AL), in modo da ottenere una soluzione omogenea. Poiché il tampone di lisi (AL) presenta un'elevata viscosità, assicurarsi di aggiungerne il volume appropriato pipettando accuratamente o utilizzando una pipetta adeguata.

Commenti e suggerimenti

- b) Bassa percentuale di etanolo utilizzata invece del 96–100%
- Ripetere la procedura di purificazione con nuovi campioni e il 96–100% di etanolo. Non utilizzare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone.
- c) Tampone di lavaggio 1 (AW1) o tampone di lavaggio 2 (AW2) preparato in modo non corretto
- Assicurarsi che i concentrati di tampone di lavaggio 1 (AW1) e tampone di lavaggio 2 (AW2) siano stati diluiti con il corretto volume di etanolo al 96–100% e miscelati capovolgendo il flacone più volte prima di iniziare la procedura.
- d) I campioni di plasma e siero non sono stati preparati, conservati o miscelati correttamente.
- La procedura di purificazione è ottimale per l'uso con campioni di plasma e siero umani. È possibile utilizzare campioni di sangue trattati con EDTA oppure citrato come anticoagulante per la preparazione del plasma. Dopo il prelievo e la centrifugazione, è possibile conservare plasma e siero a 2–8°C per un massimo di 6 ore. Per una conservazione a lungo termine, è consigliato il congelamento a una temperatura compresa tra -80°C e -20°C in aliquote.
- I campioni di siero e plasma non devono essere scongelati più di una volta. Il congelamento–decongelamento ripetuto causa la denaturazione e la precipitazione delle proteine, con la conseguente riduzione dei titoli virali e quindi delle rese di acidi nucleici virali.
- Scongelare i campioni con una leggera agitazione per garantirne un'accurata miscelazione.
- e) DNA scarso o assente nell'eluato
- Aumentare la quantità di eluito aggiunto alla reazione, se possibile.

Commenti e suggerimenti

- f) Volume di eluizione inadeguato utilizzato
- Stabilire il massimo volume di eluito adatto per la vostra applicazione a valle. Ridurre o aumentare di conseguenza il volume di eluito aggiunto all'applicazione a valle. Il volume di eluizione può essere adattato in proporzione. L'eluizione con volumi minori di tampone di eluizione (AVE) determina concentrazioni più elevate di acido nucleico.
- g) Carryover di un potenziale inibitore
- Assicurarsi di eseguire la fase di centrifugazione a secco prima dell'eluizione per evitare la potenziale inibizione degli esami downstream.
- È importante utilizzare una nuova provetta di eluizione per evitare la contaminazione con i tamponi di lavaggio residui che potrebbero causare l'inibizione degli esami downstream.
- Secondo studi di interferenza esemplari per il QIAamp DSP Virus Spin Kit e in linea con la norma ISO 20186-2:2019(E), l'eparina presente nelle provette di raccolta del sangue può influire sulla purezza degli acidi nucleici isolati e il possibile carryover negli eluiti può causare inibizioni in alcune applicazioni downstream. Pertanto, si consiglia di utilizzare campioni di sangue trattati con EDTA o citrato come anticoagulante.
- h) RNA trasportatore degradato/preparato in modo non corretto
- L'RNA trasportatore svolge una duplice funzione. In primo luogo potenzia il legame degli acidi nucleici virali con la membrana QIAamp, soprattutto se il campione contiene un numero molto limitato di molecole target. Secondariamente, aggiungendo grandi quantità di RNA trasportatore si riduce la possibilità di degradazione dell'RNA virale, nel raro caso in cui le molecole delle RNasi non vengano denaturate dai sali caotropici e dal detergente nel tampone di lisi (AL).
- Se non si aggiunge RNA trasportatore al tampone di lisi (AL), si può osservare una diminuzione della quantità di DNA o RNA virale ottenuto.
- L'RNA trasportatore può essere disciolto soltanto nel tampone di eluizione (AVE); l'RNA trasportatore disciolto deve essere aggiunto immediatamente al tampone di lisi (AL).
- Inoltre l'RNA trasportatore può rientrare nella composizione di alcuni reagenti per controllo interno degli esami downstream. In tali casi, consultare le istruzioni per l'uso fornite dal produttore degli esami downstream.

Simboli

I seguenti simboli compaiono nelle istruzioni per l'uso o su confezioni ed etichette:

Simbolo

Definizione del simbolo



<N>

Contenuto di reagenti sufficiente per <N> reazioni



Consultare le istruzioni per l'uso



Data di scadenza



Questo prodotto soddisfa i requisiti del Regolamento europeo 2017/746 per i dispositivi medico-diagnostici in vitro.



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Numero di catalogo



Nota importante



Numero di lotto



Numero di materiale (vale a dire, l'etichetta del componente)



Componenti



Volume



Limite di temperatura



Produttore

Simbolo

Definizione del simbolo



Al momento della consegna



Aprire alla consegna; conservare le colonne QIAamp MinElute a 2–8°C



Annotare la data corrente dopo aver aggiunto etanolo al flacone

ADD

Aggiunta

CONT

Contiene

LYOPH

Liofilizzato

RCNS

Ricostituito in

EtOH

Etanolo

GuHCl

Guanidina cloridrato

MALEIC ACID

Acido maleico

SUBT

Subtilisina

GTIN

Codice GTIN (Global Trade Item Number)



Porta a

NUM

Numero

Rn

R sta per revisione delle istruzioni per l'uso e n è il numero di revisione



Tenere al riparo dalla luce

Simbolo

Definizione del simbolo



Avvertenza/Cautela



UDI (identificatore univoco del dispositivo)

Appendice

Trattamento dell'RNA

Le ribonucleasi (RNasi) sono enzimi molto stabili e attivi che non necessitano normalmente di cofattori per espletare la loro funzione. Dato che le RNasi sono difficilmente inattivabili e dato che sono sufficienti in piccolissime quantità per distruggere l'RNA, si raccomanda di non utilizzare plastica e vetreria da laboratorio senza aver prima eliminato una possibile contaminazione da RNasi. Prestare particolare attenzione allo scopo di evitare di introdurre inavvertitamente RNasi nel campione di RNA durante o dopo la procedura di purificazione. Per creare e mantenere un ambiente esente da RNasi, mentre si lavora con l'RNA adottare le seguenti precauzioni durante il pretrattamento e l'uso di recipienti monouso e riutilizzabili e di soluzioni.

Raccomandazioni generali per il trattamento

Adottare sempre una corretta tecnica di asepsi microbiologica quando si opera con l'RNA. Le mani e le particelle di polvere possono essere vettori di batteri e muffe e sono la fonte più comune di contaminazione da RNasi. Indossare sempre guanti in lattice o vinile quando si manipolano i reagenti e i campioni di RNA, per evitare la contaminazione da RNasi dovuta alla superficie della pelle o alla polvere delle attrezzature di laboratorio. Cambiare spesso i guanti e tenere chiuse le provette.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Indice	N. cat.
QIAamp DSP Virus Spin Kit (50)	Per 50 preparazioni: Colonne QIAamp MinElute, tamponi, reagenti, provette, VacConnectors	61704
Prodotti correlati		
QIAcube Connect MDx*	Strumento e garanzia di 1 anno sulle parti e sulla funzionalità di laboratorio	9003070
Accessori		
Rotor Adapters	Per 240 preparazioni: 240 Adattatori per rotore monouso e 240 provette per eluizione (1,5 ml); per uso con il QIAcube Connect MDx	990394
Rotor Adapter Holder	Supporto per 12 adattatori per rotore monouso, per uso con il QIAcube Connect MDx	990392
Sample Tubes CB	1000 provette a fondo conico con tappo a vite senza base (2 ml) per uso con il QIAcube Connect MDx	990382
Shaker Rack Plugs	Per il caricamento del rack per agitatori QIAcube Connect MDx	9017854
Reagent Bottles, 30 ml	Flaconi per reagenti (30 ml) con tappi; confezione da 6; per l'uso con QIAcube Connect MDx	990393

Filter-Tips, 1000 µl	Puntali con filtro monouso, su rack; (8 x 128). Da utilizzare con il QIAcube Connect MDx	990352
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore	Puntali con filtro monouso, foro largo, su rack; (8 x 128); non necessari per tutti i protocolli. Da utilizzare con il QIAcube Connect MDx	990452
Filter-Tips, 200 µl	Puntali con filtro monouso, su rack; (8 x 128). Da utilizzare con gli strumenti QIAcube Connect MDx e QIASymphony SP/AS	990332

* QIAcube Connect MDx non è disponibile in tutti i paesi. Per ulteriori dettagli, contattare i servizi tecnici QIAGEN.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti consultare le Istruzioni per l'uso del rispettivo kit QIAGEN. Le Istruzioni per l'uso dei kit QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richieste ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

Cronologia delle revisioni del documento

Revisione	Descrizione
R1, giugno 2022	<p>Versione 2, revisione 1</p> <ul style="list-style-type: none">● Aggiornamento alla versione 2 del kit per la conformità a IVDR● Aggiornamento dei capitoli "Uso previsto" e "Limitazioni"● Aggiornamento di "Descrizione e principio"● Aggiornamento di "Materiali necessari ma non in dotazione" (aggiunta dei principi attivi) e del "Materiale necessario ma non in dotazione"● Aggiornamento delle "Avvertenze e precauzioni" (aggiunta di informazioni sulle emergenze e del capitolo "Smaltimento")● Aggiornamento di "Conservazione e manipolazione dei reagenti"● Aggiornamento di "Prelievo, conservazione e trasporto dei campioni"● Aggiornamento di note e procedure importanti● Aggiornamento delle "Caratteristiche delle prestazioni"● Aggiornamento del capitolo "Appendice"● Aggiunta della Guida alla risoluzione dei problemi● Aggiornamento del capitolo "Simboli"● Aggiornamento delle "Informazioni sugli ordini"

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Contratto di licenza limitata per il QIAamp® DSP Virus Spin Kit

L'uso di questo prodotto implica l'accordo di qualsiasi acquirente o utente del prodotto ai seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e alle presenti Istruzioni per l'uso e soltanto con i componenti contenuti nel pannello. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo pannello con qualsiasi componente non incluso in questo pannello, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, le presenti Istruzioni per l'uso e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. Al di fuori delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non garantisce che questo pannello e/o il suo utilizzo non violino i diritti di terzi.
3. Questo pannello e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del pannello accettano di non prendere o permettere a chiunque altro di prendere misure che potrebbero portare o facilitare qualsiasi atto vietato sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo pannello e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAcube®, QIAamp® (QIAGEN Group). I marchi registrati, di fabbrica e così via utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, devono essere considerati come protetti dalla legge.

1127542IT 06/2022 HB-3031-001 © 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Ordini www.qiagen.com/shop | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com