

Janeiro de 2021

Instruções de uso (Manual) do QIAamp[®] DSP Virus Spin Kit



Versão 1



Para uso em diagnóstico in vitro



61704



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden
Tel.: +49-2103-29-0



1122785BR



Conteúdo

Uso pretendido.....	5
Descrição e procedimento	6
Purificação automatizada de ácidos nucleicos virais no QIAcube ou QIAcube Connect MDx.....	6
Resumo e explicação	13
Materiais fornecidos	14
Conteúdo do kit	14
Materiais necessários, mas não fornecidos	15
Avisos e precauções	16
Informações de segurança.....	16
Armazenamento e manuseio de reagentes	19
Armazenamento e manuseio de espécimes.....	20
Procedimento	21
Pontos importantes antes de começar	21
Manuseio das colunas QIAamp MinElute	22
Centrifugação	22
Processar colunas QIAamp MinElute em uma microcentrífuga	23
Preparar reagentes e tampões	23
Protocolo: Purificação de ácidos nucleicos virais de plasma ou soro usando uma microcentrífuga ou o QIAcube/QIAcube Connect MDx	27
Controle de qualidade	31
Limitações.....	31

Símbolos	32
Informações de contato	34
Apêndice.....	35
Informações para pedidos	38
Histórico de revisões do documento.....	40

Uso pretendido

○ QIAamp DSP Virus Spin Kit é um sistema que usa tecnologia de membrana de sílica (tecnologia QIAamp) para isolamento e purificação de ácidos nucleicos virais de amostras biológicas.

○ produto deve ser usado por usuários profissionais, como técnicos e médicos, que são treinados em técnicas biológicas moleculares.

○ QIAamp DSP Virus Spin Kit deve ser usado para diagnóstico in vitro.

Descrição e procedimento

O procedimento do QIAamp DSP Virus Spin é constituído por 4 etapas (lise, ligação, lavagem e eluição) e é realizado usando as colunas QIAamp MinElute® em uma microcentrífuga padrão ou automatizado no QIAcube e no QIAcube Connect MDx. O procedimento foi concebido para minimizar o potencial de contaminação cruzada entre amostras e permite o manuseio seguro de amostras potencialmente infecciosas. O procedimento do QIAamp DSP Virus Spin é simples e adequado para o processamento de várias amostras em simultâneo. O QIAamp DSP Virus Spin Kit pode ser utilizado para o isolamento de RNA e DNA virais de uma vasta gama de vírus de RNA e DNA. Contudo, não foram estabelecidas características de desempenho para cada espécie de vírus; o usuário deve validá-las.

Purificação automatizada de ácidos nucleicos virais no QIAcube ou QIAcube Connect MDx

O QIAcube e o QIAcube Connect MDx realizam o isolamento e a purificação automatizados de ácidos nucleicos. Eles podem processar até 12 amostras em uma única execução.

Com a automatização do QIAamp DSP Virus Spin Kit no QIAcube ou no QIAcube Connect MDx, o instrumento pode processar menos de 50 amostras devido aos volumes mortos, à evaporação e ao consumo adicional de reagentes pela pipetagem automatizada. A QIAGEN garante apenas 50 preparos de amostras com o uso manual do QIAamp DSP Virus Spin Kit.



Figura 1. O QIAcube.

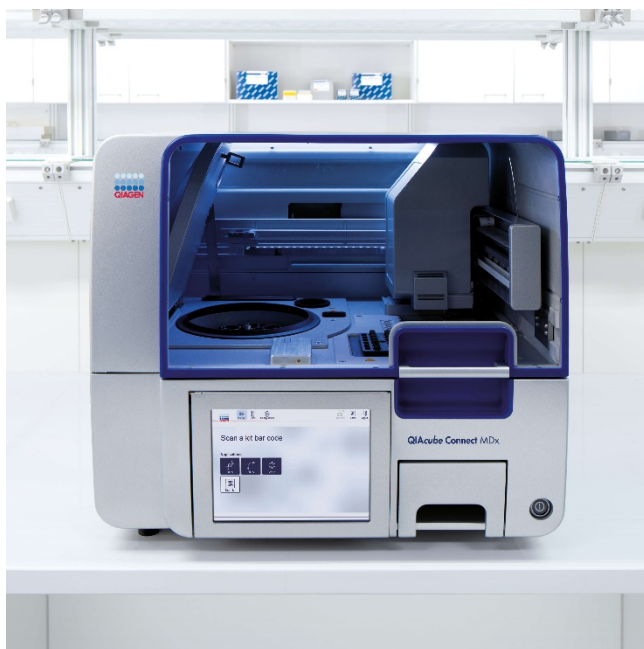


Figura 2. O QIAcube Connect MDx.

Lise com a QIAGEN Protease

As amostras são lisadas sob condições altamente desnaturantes a temperaturas elevadas. A lise é realizada na presença de QIAGEN Protease e Buffer AL, que juntos garantem a inativação de RNases.

Adsorção para a membrana da QIAamp MinElute

As condições de ligação são ajustadas com a adição de etanol para permitir a ligação ideal de RNA e DNA virais à membrana. A seguir, os lisados são transferidos para a coluna QIAamp MinElute e os ácidos nucleicos virais são adsorvidos para a membrana de gel de sílica à medida que o lisado é escorrido por centrifugação. As condições de sal e de pH garantem que a proteína e outros contaminantes, que podem inibir a reação da cadeia de

polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) e outras reações enzimáticas a jusante, não são retidas na membrana da QIAamp MinElute.

Os tubos de lavagem de 2 ml (fornecidos) suportam a coluna QIAamp MinElute durante as etapas de carregamento e lavagem.

Remoção de contaminantes residuais

Os ácidos nucleicos permanecem ligados à membrana, enquanto os contaminantes são eficientemente lavados durante três etapas de lavagem. Em uma única etapa, RNA e DNA virais altamente puros são eluídos no Buffer AVE, equilibrado à temperatura ambiente.

Eluição de ácidos nucleicos puros

A eluição é realizada usando Buffer AVE. As colunas QIAamp MinElute permitem volumes mínimos de eluição de apenas 20 µl. Baixo volume de eluição leva a eluatos de ácido nucleico altamente concentrados.

Para aplicações a jusante que requerem pequenos volumes iniciais (por exemplo, alguns ensaios PCR e RT-PCR), um eluato mais concentrado pode aumentar a sensibilidade do ensaio.

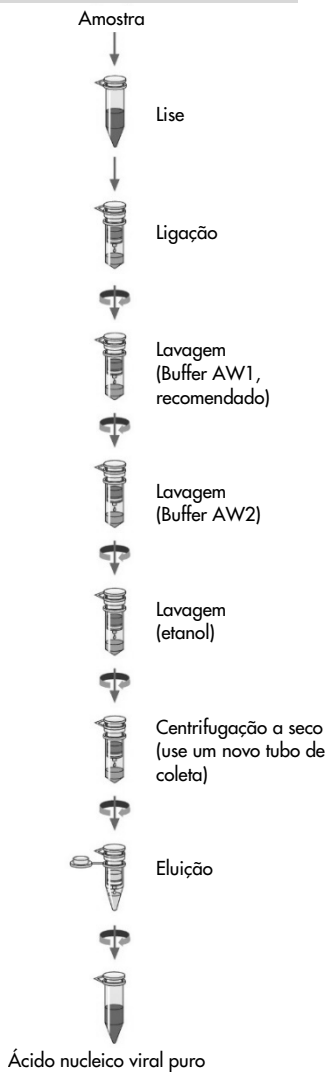
Para aplicações a jusante que requerem um volume inicial maior, o volume de eluição pode ser aumentado para 150 µl. No entanto, um aumento no volume de eluição reduzirá a concentração de ácidos nucleicos no eluato.

O volume de eluato recuperado pode ter até menos 5 µl do que o volume de solução tampão de eluição aplicado à coluna; por exemplo, um volume de tampão de eluição de 20 µl resulta em um eluato final de >15 µl. O volume de eluato recuperado depende da natureza da amostra.

O ácido nucleico eluído é coletado em tubos de eluição de 1,5 ml (ET, fornecidos). É recomendado o armazenamento de DNA ou RNA entre -30 e -15 °C.

Os rendimentos de ácidos nucleicos virais isolados de amostras biológicas se encontram, normalmente, abaixo de 1 µg. Os métodos de amplificação quantitativa são recomendados para determinação de rendimentos. Quando estiver quantificando ácidos nucleicos isolados com o protocolo QIAamp DSP Virus Spin, lembre-se de que o RNA carreador na amostra será consideravelmente superior ao RNA viral.

Procedimento do QIAamp DSP Virus Spin



Automatizável no QIAcube/QIAcube Connect MDx

RNA carreador

O RNA carreador serve para duas finalidades: em primeiro lugar, ele aprimora a ligação dos ácidos nucleicos virais à membrana QIAamp, especialmente se houver muito poucas moléculas-alvo na amostra. Em segundo lugar, a adição de grandes quantidades de RNA carreador reduz a chance de degradação do RNA viral no caso raro de moléculas de RNase escaparem da desnaturação por sais caotrópicos e detergente no Buffer AL. Se o RNA carreador não for acrescentado ao Buffer AL, isso pode levar a uma recuperação reduzida de RNA ou DNA viral.

Diferentes sistemas de amplificação variam em eficiência, dependendo da quantidade total de ácido nucleico presente na reação. Os eluatos deste kit contêm ácidos nucleicos virais e RNA carreador, e as quantidades de RNA carreador excederão, e muito, as quantidades de ácidos nucleicos virais. Portanto, os cálculos de quanto eluato adicionar a amplificações a jusante deverão ser baseados na quantidade de RNA carreador adicionado. Para obter os níveis mais elevados de sensibilidade em reações de amplificação, pode ser necessário ajustar a quantidade de RNA carreador adicionado ao Buffer AL.

Adição de controles internos

Usar o protocolo QIAamp DSP Virus Spin juntamente com sistemas de amplificação comercialmente disponíveis pode exigir a introdução de um controle interno no procedimento de purificação. O RNA ou DNA de controle interno deve ser adicionado junto com o RNA carreador ao tampão de lise. Para obter uma ótima eficiência na purificação, as moléculas de controle interno devem ter mais de 200 nucleotídeos, pois as moléculas menores não são recuperadas com eficiência.









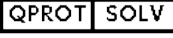



Consulte as instruções do fabricante para determinar a concentração ideal. O uso de uma concentração diferente da recomendada pode reduzir a eficiência da amplificação.

Resumo e explicação

O QIAamp DSP Virus Spin Kit utiliza uma tecnologia consagrada para purificar DNA e RNA virais simultaneamente. O kit combina as propriedades de ligação seletiva de uma membrana à base de sílica com volumes de eluição flexíveis de entre 20 e 150 µl. O procedimento é adequado para uso com plasma e soro. As amostras devem ser frescas ou congeladas, desde que não tenham sido congeladas e descongeladas mais do que uma vez (consulte a página 20). Os ácidos nucleicos virais são eluídos em Buffer AVE e estão prontos para serem utilizados em reações de amplificação ou para serem armazenados entre -30 e -15 °C.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

QIAamp DSP Virus Spin Kit			
Nº de referência			61704
Número de preparos			50 [§]
QIAamp MinElute	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Colunas QIAamp MinElute com tubos de lavagem) (WT) (2 ml)		50
LT	Lysis Tubes (Tubos de lise) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (Tubos de eluição) (1,5 ml)		50
WT	Wash Tubes (Tubos de lavagem) (2 ml)		5 x 50
AL	Lysis Buffer (Tampão de lise)*		33 ml
AW1	Wash Buffer 1 (Tampão de lavagem 1)* (concentrado)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (Tampão de lavagem 2) [†] (concentrado)		13 ml
AVE	Elution Buffer (Tampão de eluição) [†] (tampas rochas)		4 x 2 ml
PS	Protease Solvent (Solvente de protease) [†]		4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (RNA carreador) (tampas vermelhas)		310 µg
QP	QIAGEN Protease [†]		1 frasco
-	Instruções de uso (Manual)		1

* Contém um sal caotrópico. Tome as medidas de segurança apropriadas e use luvas durante o manuseio. Não compatível com desinfetantes que contenham água sanitária. Para obter mais informações, consulte a página 16.

[†] Contém azida de sódio como conservante.

[†] Consulte "Preparar reagentes e tampões", na página 23.

[§] Com a automatização do QIAamp DSP Virus Spin Kit no instrumento QIAcube ou QIAcube Connect MDx, o instrumento pode processar menos de 50 amostras devido aos volumes mortos, à evaporação e ao consumo adicional de reagentes pela pipetagem automatizada. A QIAGEN garante apenas 50 preparos de amostras com o uso manual do QIAamp DSP Virus Spin Kit.

Materiais necessários, mas não fornecidos

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (safety data sheets, SDSs) apropriadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

- Etanol (96 a 100%)*
- Pipetas† e ponteiros de pipetas (para evitar a contaminação cruzada, recomendamos fortemente a utilização de ponteiros de pipetas com barreiras contra aerossóis)
- Bloco de aquecimento† para lise de amostras a 56 °C
- Microcentrífuga† (com rotor para tubos de 1,5 ml e 2 ml)
- Agitador tipo vórtex
- Para amostras <200 µl: solução NaCl a 0,9%

Apenas para o procedimento automatizado

- Rotor Adapters, n° de ref. 990394
- Rotor Adapter Holder, n° de ref. 990392
- Sample Tubes CB (2 ml), n° de ref. 990382 (tubo de inserção de amostra)
- Shaker Rack Plugs, n° de ref. 9017854
- Reagent Bottles, 30 ml, n° de ref. 990393
- Filter-Tips, 1000 µl, n° de ref. 990352
- Filter-Tips, 1000 µl, orifício largo, n° de ref. 990452
- Filter-Tips, 200 µl, n° de ref. 990332
- SafeSeal Tube, 1.5 ml, Sarstedt® (n° de ref. 72.706)

* Não utilize álcool desnaturado, pois ele contém outras substâncias, como metanol ou metilacetona.

† Para garantir que as amostras sejam devidamente processadas nos procedimentos do QIAamp DSP Virus Spin Kit, recomendamos fortemente que os instrumentos (por ex., pipetas e blocos de aquecimento) sejam calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Avisos e precauções

Esteja ciente de que poderá ser necessário relatar incidentes graves que tenham ocorrido em relação ao dispositivo ao fabricante e à autoridade regulatória na qual o usuário e/ou o paciente estão estabelecidos.

Informações de segurança

Para uso em diagnóstico in vitro

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (SDSs) aplicáveis. Elas estão disponíveis online em formato PDF (conveniente e compacto) em www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a SDS para cada kit e para componente do kit QIAGEN.



CUIDADO: NÃO adicione água sanitária ou soluções ácidas diretamente nos resíduos resultantes do preparo de amostras.

O Buffer AL e o Buffer AW1 contêm cloridrato de guanidina, que pode formar compostos altamente reativos quando misturados com água sanitária. Se líquido contendo essas soluções tamponadas for derramado, limpe com água e detergente de laboratório adequado. Se o líquido derramado contiver agentes potencialmente infecciosos, limpe a área afetada primeiro com água e detergente de laboratório e, em seguida, com solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v).

Se os frascos dos tampões forem danificados ou apresentarem vazamento, use luvas e óculos de proteção ao descartá-los para evitar lesões a si mesmo ou a outras pessoas.

A QIAGEN não testou o resíduo líquido gerado pelos procedimentos do QIAamp DSP Virus Spin em relação a materiais residuais infecciosos. A contaminação do resíduo líquido com materiais residuais infecciosos é altamente improvável, mas não pode ser excluída completamente. Portanto, o resíduo líquido deve ser considerado infeccioso, e manipulado e descartado de acordo com os regulamentos locais de segurança.

As seguintes afirmações de risco e precauções se aplicam a componentes do QIAamp DSP Virus Spin Kit:

Buffer AL



Contém: cloridrato de guanidina; ácido maleico. Aviso! Pode ser prejudicial se ingerido ou inalado. Provoca a irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Pode causar reação alérgica na pele. Se a irritação nos olhos persistir: consulte um médico. Retire a roupa contaminada e lave-a, antes de usá-la novamente. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Buffer AW1



Contém: cloridrato de guanidina. Aviso! Nocivo, se engolido ou inalado. Provoca a irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Ligue para um CENTRO DE ENVENENAMENTO ou médico, se não se sentir bem. Elimine o conteúdo/recipiente em um local de eliminação de resíduos aprovado. Retire a roupa contaminada e lave-a, antes de usá-la novamente. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

QIAGEN Protease



Contém: subtilisina. Perigo! Causa irritação leve da pele. Causa lesões graves nos olhos. Se inalado, pode causar sintomas de asma ou alergia ou dificuldades respiratórias. Evite respirar poeira/fumaça/gás/névoa/vapores/spray. Elimine o conteúdo/recipiente em um local de eliminação de resíduos aprovado. Se tiver sintomas respiratórios: ligue para um CENTRO DE ENVENENAMENTO ou médico. EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS: enxágue cuidadosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e fáceis de remover. Continue enxaguando. SE INALADO: se houver dificuldade para respirar, leve a vítima a um local com ar livre e deixe-a em repouso em uma posição confortável para respirar. Entre em contato imediatamente com um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTOS ou médico. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Use proteção respiratória.

Armazenamento e manuseio de reagentes

As colunas QIAamp MinElute devem ser armazenadas entre 2 e 8 °C após a entrega. Todos os tampões podem ser armazenados à temperatura ambiente (15 a 25 °C).

O RNA carreador liofilizado pode ser armazenado à temperatura ambiente até a data de validade na caixa do kit. O RNA carreador só pode ser dissolvido em Buffer AVE. O RNA carreador dissolvido deverá ser imediatamente adicionado ao Buffer AL, conforme descrito na página 23, apenas para o procedimento manual. Essa solução deve ser preparada fresca, mantendo-se estável entre 2 e 8 °C por até 48 horas. As partes não usadas do RNA carreador dissolvidas no Buffer AVE devem ser congeladas em alíquotas, entre -30 e -15 °C.

A QIAGEN Protease (QP) liofilizada pode ser armazenada à temperatura ambiente até o fim do prazo de validade do kit sem que isto afete seu desempenho.

A QIAGEN Protease (QP) reconstituída em solvente de protease (PS) mantém-se estável por até um ano, desde que seja armazenada entre 2 e 8 °C, mas apenas até o fim do prazo de validade do kit. Deve-se evitar manter a solução de estoque da QIAGEN Protease à temperatura ambiente durante períodos de tempo prolongados.

O tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído e o tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído permanecem estáveis por até 1 ano quando armazenados à temperatura ambiente, mas apenas até o fim do prazo de validade indicado na caixa do kit.

Armazenamento e manuseio de espécimes

Após a coleta e a centrifugação, o plasma ou o soro podem ser armazenados entre 2 e 8 °C por até 6 horas. Para o armazenamento prolongado, recomenda-se o congelamento em alíquotas entre -80 e -20 °C. As amostras congeladas de plasma ou soro não devem ser descongeladas mais de uma vez. O congelamento e o descongelamento recorrentes levam à desnaturação e à precipitação de proteínas, resultando em títulos virais reduzidos e, portanto, em produções reduzidas de ácidos nucleicos virais. Além disso, os crioprecipitados formados durante o congelamento e o descongelamento irão obstruir a membrana da QIAamp MinElute. Se os crioprecipitados estiverem visíveis, eles podem ser peletizados por centrifugação a cerca de 6800 x g por 3 minutos. O sobrenadante clarificado deve ser removido e processado imediatamente sem perturbar o pellet.

Procedimento

Pontos importantes antes de começar

- Assim que receber o kit, verifique se há algum dano nos respectivos componentes. Se os blísteres ou os frascos dos tampões estiverem danificados, entre em contato com a Assistência Técnica da QIAGEN ou com o distribuidor local. No caso de derramamento de líquidos, consulte "Avisos e precauções" (página 16). Não use componentes de kits danificados, pois eles podem prejudicar o desempenho do kit.
- Use sempre equipamentos sem RNase.
- Troque sempre as ponteiros das pipetas entre as transferências de líquidos. Para minimizar a contaminação cruzada, recomenda-se o uso de ponteiros de pipetas com barreira contra aerossóis.
- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente (15–25°C).
- Use sempre luvas descartáveis e verifique regularmente se elas não estão contaminadas com o material da amostra. Descarte as luvas se elas se contaminarem.
- Para minimizar a contaminação cruzada, abra apenas um tubo por vez.
- Não use componentes de outros kits com os kits que estiver usando no momento, a menos que os números de lote sejam idênticos.
- Evite a contaminação microbiana dos reagentes do kit.
- Para garantir a segurança em relação a materiais potencialmente infecciosos, recomenda-se trabalhar em condições de fluxo de ar laminar até que as amostras sejam lisadas.
- Para automação, siga as instruções nas fichas de protocolo (QIAcube) ou na tela do software (QIAcube Connect MDx) e consulte os manuais do usuário adequados (para o QIAcube e o QIAcube Connect MDx).
- Este kit apenas deve ser usado por uma equipe treinada em práticas laboratoriais de diagnóstico in vitro.

Manuseio das colunas QIAamp MinElute

Dada a sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, é necessário tomar as seguintes precauções ao manusear colunas QIAamp MinElute para evitar a contaminação cruzada entre os preparos de amostras:

- Aplique cuidadosamente a amostra ou solução à coluna QIAamp MinElute. Pipete a amostra na coluna QIAamp MinElute sem molhar a borda da coluna.
- Troque sempre as ponteiros das pipetas entre transferências de líquidos. Recomenda-se o uso de ponteiros de pipetas com barreira contra aerossóis.
- Evite o contato da membrana da QIAamp MinElute com a ponteira da pipeta.
- Após todas as etapas de agitação em vórtex pulsador, centrifugue brevemente os tubos da microcentrífuga para remover as gotas de dentro da tampa.
- Use luvas durante todo o procedimento. Em caso de contato entre as luvas e a amostra, troque as luvas imediatamente.

Centrifugação

- Os tubos de lavagem e os tubos de eluição para todas as etapas de centrifugação são fornecidos juntamente com o kit.
- A centrifugação das colunas QIAamp MinElute é realizada a aproximadamente 6000 x g para reduzir o ruído da centrífuga. Centrifugar colunas QIAamp MinElute à velocidade máxima não afetará o rendimento de DNA ou RNA.
- Para a centrifugação a seco no final do procedimento de lavagem e para eluição, a centrifugação deve ser realizada à velocidade máxima.
- Todas as etapas de centrifugação devem ser realizadas à temperatura ambiente (15 a 25 °C).

Processar colunas QIAamp MinElute em uma microcentrífuga

- Feche a coluna QIAamp MinElute antes de colocá-la na microcentrífuga. Centrifugue conforme descrito.
- Remova a coluna QIAamp MinElute e o tubo de lavagem da microcentrífuga.
- Coloque a coluna QIAamp MinElute em um novo tubo de lavagem. Descarte o filtrado e o tubo de lavagem. Observe que o filtrado pode conter resíduos nocivos, pelo que deve ser descartado adequadamente.
- Abra somente uma coluna QIAamp MinElute de cada vez e tome cuidado para evitar a geração de aerossóis.

Para um processamento paralelo eficiente de várias amostras, recomendamos preencher um rack com tubos de lavagem para que as colunas QIAamp MinElute possam ser transferidas após a centrifugação. Os tubos de lavagem usados contendo o filtrado podem ser descartados, enquanto os novos tubos de lavagem contendo as colunas QIAamp MinElute podem ser colocados diretamente na microcentrífuga.

Preparar reagentes e tampões

- Preparo de RNA

Ao preparar o RNA viral, trabalhe rapidamente durante as etapas manuais do procedimento e leia o Apêndice na página 35 antes de começar.

- Preparar a QIAGEN Protease

Adicione todo o conteúdo do frasco contendo 4,4 ml de solvente de protease (PS) ao frasco de QIAGEN Protease (QP) liofilizada e misture cuidadosamente. Para evitar a formação de espuma, misture, invertendo o tubo várias vezes. Certifique-se de que a QIAGEN Protease (QP) esteja completamente dissolvida.




Não adicione QIAGEN Protease (QP) diretamente ao Buffer AL.*

* Contém sal caotrópico. Tome as medidas apropriadas de segurança em laboratório e use luvas durante o manuseio. Não compatível com desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 16 para obter informações de segurança.

A QIAGEN Protease (QP) reconstituída em solvente de protease (PS) mantém-se estável durante um ano, desde que seja armazenada entre 2 e 8 °C, mas apenas até o fim do prazo de validade do kit. Deve-se evitar manter a solução de estoque da QIAGEN Protease à temperatura ambiente durante períodos de tempo prolongados.

- Adição de RNA carreador ao Buffer AL* (apenas para o procedimento manual)

Adicione 310 µl de Buffer AVE ao tubo que contém 310 µg de RNA carreador liofilizado para obter uma solução de 1 µg/µl. Dissolva completamente o RNA carreador, divida-o em alíquotas no tamanho mais conveniente e armazene-o entre -25 e -15 °C. Não congele–descongele as alíquotas do RNA carreador mais de 3 vezes.

-  O RNA carreador não se dissolve no Buffer AL. Ele precisa, primeiro, ser dissolvido no Buffer AVE e, depois, adicionado ao Buffer AL.

Calcule o volume da mistura de Buffer AL–RNA carreador necessário por lote de amostras selecionando o número de amostras que serão processadas simultaneamente a partir da Tabela 1, página 25. Para números maiores de amostras, os volumes podem ser calculados através do seguinte cálculo amostral:

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

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

onde: n = número de amostras a serem processadas simultaneamente

y = volume calculado do Buffer AL

z = volume de RNA carreador–Buffer AVE a ser adicionado ao Buffer AL

Misture, com cuidado, invertendo o tubo 10 vezes. Para evitar a formação de espuma, não centrifugue. Para o procedimento automatizado, a adição de RNA carreador ao Buffer AL é realizada pelo QIAcube/QIAcube Connect MDx.

* Contém sal caotrópico. Tome as medidas apropriadas de segurança em laboratório e use luvas durante o manuseio. Não compatível com desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 16 para obter informações de segurança.

Tabela 1. Volumes (Vol.) de Buffer AL e da mistura de RNA carreador–Buffer AVE necessários para números específicos (N°) de amostras para o procedimento do QIAamp DSP Virus Spin

N° de amostras	Vol. Buffer AL (ml)	Vol. RNA carreador–AVE (µl)	N° de amostras	Vol. Buffer AL (ml)	Vol. RNA carreador–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



O procedimento de preparo de amostras é otimizado para 5,6 µg de RNA carreador por amostra. Se for demonstrado que menos RNA carreador é melhor para o seu sistema de amplificação, transfira apenas a quantidade necessária de RNA carreador dissolvido para os tubos que contêm Buffer AL. Para cada micrograma de RNA carreador necessário por preparo, adicione 5 µl de Buffer AVE–RNA carreador dissolvido por mililitro de Buffer AL. O uso de menos de 5,6 µg de RNA carreador por amostra deve ser validado para cada tipo específico de amostra e ensaio posterior.

Buffer AW1 *

Adicione 25 ml de etanol (96 a 100%) a um frasco contendo 19 ml de concentrado de Buffer AW1, conforme descrito no frasco. Marque a caixa de seleção no rótulo para indicar que o etanol foi adicionado. Armazene o Buffer AW1 reconstituído à temperatura ambiente. O Buffer AW1 reconstituído mantém-se estável por até um ano, desde que seja armazenado à temperatura ambiente, mas apenas até o fim do prazo de validade do kit.



Misture sempre o Buffer AW1 reconstituído agitando antes de iniciar o procedimento.

Buffer AW2†

Adicione 30 ml de etanol (96 a 100%) a um frasco contendo 13 ml de concentrado de Buffer AW2, conforme descrito no frasco. Marque a caixa de seleção no rótulo para indicar que o etanol foi adicionado. Armazene o Buffer AW2 reconstituído à temperatura ambiente. O Buffer AW2 reconstituído mantém-se estável por até um ano, desde que seja armazenado à temperatura ambiente, mas apenas até o fim do prazo de validade do kit.



Misture sempre o Buffer AW2 reconstituído agitando antes de iniciar o procedimento.

Eluição de ácidos nucleicos

O tampão de eluição deve ser equilibrado à temperatura ambiente antes de ser aplicado à coluna.

* Contém sal caotrópico. Tome as medidas apropriadas de segurança em laboratório e use luvas durante o manuseio. Não compatível com desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 16 para obter informações de segurança.

† Contém azida de sódio como conservante.

Protocolo: Purificação de ácidos nucleicos virais de plasma ou soro usando uma microcentrífuga ou o QIAcube/QIAcube Connect MDx

Para a purificação de ácidos nucleicos virais de 200 µl de plasma ou soro usando o QIAamp DSP Virus Spin Kit e uma microcentrífuga ou automatizada no QIAcube ou no QIAcube Connect MDx.

Pontos importantes antes de começar

- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente (15–25°C).
- O seguinte procedimento fornece instruções para o processamento de uma única amostra. No entanto, podem ser processadas várias amostras ao mesmo tempo; o número depende da capacidade da microcentrífuga usada.
- O processamento automatizado de 2–10 ou 12 amostras pode ser realizado no QIAcube ou no QIAcube Connect MDx.
- Para automação, siga as instruções nas fichas de protocolo (QIAcube) ou na tela do software (QIAcube Connect MDx) e consulte os manuais do usuário adequados (para o QIAcube e o QIAcube Connect MDx).


O que fazer antes de começar

- Equilibre as amostras à temperatura ambiente (15 a 25 °C).
- Equilibre o Buffer AVE à temperatura ambiente para eluição na etapa 14.
- Coloque um bloco de aquecimento a 56 °C ±3 °C para utilização na etapa 4.
- Certifique-se de que o Buffer AW1, o Buffer AW2 e a QIAGEN Protease (QP) tenham sido preparados de acordo com as instruções nas páginas 21–26.
- Adicione o RNA carreador reconstituído no Buffer AVE ao Buffer AL, de acordo com as instruções na página 23 (apenas para o procedimento manual).

Procedimento

- Para o procedimento manual com a microcentrifuga, siga as etapas 1–14
 - Este procedimento pode ser automatizado no QIAcube Connect MDx em duas versões diferentes:
 - Plasma ou Soro_Padrão: Automação completa usando 200 µl de amostra (começando pela etapa 1)
 - Plasma ou Soro_Lise manual: Parcialmente automatizada com lise manual fora do equipamento usando um volume de 200 µl da amostra inicial (começando após a etapa 5)
- Nota: Para seleção de protocolo no QIAcube, consulte as fichas de protocolo (<https://www.qiagen.com/us/qiacube/standard/search/>).

1. Pipete 25 µl de QIAGEN Protease (QP) em um tubo de lise (LT).


 Leia "Preparar reagentes e tampões", na página 23, para obter mais informações sobre como suspender novamente a QIAGEN Protease (QP) em solvente de protease (PS).

2. Adicione 200 µl de plasma ou soro ao tubo de lise (LT).

Se o volume de amostra for inferior a 200 µl, adicione o volume adequado de solução de cloreto de sódio a 0,9% para que o volume de protease e de amostra atinja um total de 225 µl.

3. Adicione 200 µl de Buffer AL (contendo 28 µg/ml de RNA carreador). Feche a tampa e misture por agitação em vórtex pulsador por ≥ 15 segundos.

Para garantir uma lise eficiente, é essencial que a amostra e o Buffer AL sejam completamente misturados, para produzir uma solução homogênea.


 Não adicione QIAGEN Protease (QP) diretamente ao Buffer AL.

4. Incube a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $15\text{ min} \pm 1\text{ min}$ em um bloco de aquecimento.

5. Centrifugue brevemente o tubo de lise (LT) para remover as gotas de dentro da tampa.

Nota: Se a lise manual (etapas 1–5) tiver sido realizada fora do equipamento, as seguintes etapas (etapas 6–14) podem ser automatizadas: "Protocolo de lise manual" no QIAcube ou QIAcube Connect MDx ou "Protocolo de amostras grandes de plasma_Lise manual" no QIAcube.

6. Adicione 250 µl de etanol (96–100%) à amostra, feche a tampa e misture bem por agitação em vórtex pulsador por ≥ 15 s. Incube o lisado com o etanol por 5 min \pm 30 s à temperatura ambiente (15 a 25 °C).

 Se a temperatura ambiente exceder os 25 °C, o etanol deve ser resfriado em gelo antes de ser adicionado ao lisado.

7. Centrifugue brevemente o tubo para remover as gotas de dentro da tampa.

8. Aplique cuidadosamente todo o lisado da etapa 7 na coluna QIAamp MinElute sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante >1 min. Coloque a coluna QIAamp MinElute em um tubo de lavagem (WT) limpo de 2 ml e descarte o tubo de lavagem contendo o filtrado.

Se o lisado não tiver passado completamente pela coluna após a centrifugação, centrifugue novamente a uma velocidade maior até esvaziar a coluna QIAamp MinElute.


9. Abra cuidadosamente a coluna QIAamp MinElute e adicione 500 µl de Buffer AW1 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min. Coloque a coluna QIAamp MinElute em um tubo de lavagem limpo (WT) de 2 ml e descarte o tubo de lavagem contendo o filtrado.


10. Abra cuidadosamente a coluna QIAamp MinElute e adicione 500 µl de Buffer AW2 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante >1 min. Coloque a coluna QIAamp MinElute em um tubo de lavagem limpo de 2 ml e descarte o tubo de lavagem contendo o filtrado.

11. Abra cuidadosamente a coluna QIAamp MinElute e adicione 500 µl de etanol (96 a 100%) sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante >1 min. Descarte o tubo de lavagem contendo o filtrado.

O carryover de etanol para o eluato pode causar problemas em aplicações a jusante. Os rotores de algumas centrífugas podem vibrar na desaceleração, fazendo com que o fluxo de passagem, que contém etanol, entre em contato com a coluna QIAamp MinElute. Remover a coluna QIAamp MinElute e o tubo de lavagem do rotor também pode fazer com que o fluxo de passagem entre em contato com a coluna QIAamp MinElute.

12. Coloque a coluna QIAamp MinElute em um tubo de lavagem (WT) limpo de 2 ml. Centrifugue à velocidade máxima (aproximadamente 20.000 x g) durante 3 min ± 30 s para secar a membrana completamente.
13. Coloque a coluna QIAamp MinElute em um novo tubo de lavagem (WT) de 2 ml, abra a tampa e incube o conjunto a 56 °C ± 3 °C durante 3 min ± 30 s para secar a membrana completamente.
Esta etapa serve para evaporar qualquer líquido restante.
14. Coloque a coluna QIAamp MinElute em um tubo de eluição (ET) e descarte o tubo de lavagem com o filtrado. Abra cuidadosamente a tampa da coluna QIAamp MinElute e aplique 20–150 µl de Buffer AVE no centro da membrana. Feche a tampa e incube à temperatura ambiente durante 5 min. Centrifugue à velocidade máxima (aproximadamente 20.000 x g) durante >1 min.

 No caso de todos os procedimentos automatizados, remova os eluatos do instrumento diretamente após terminar a execução e armazene-os adequadamente.

 Certifique-se de que o tampão de eluição seja equilibrado à temperatura ambiente. Se a eluição for feita em pequenos volumes (<50 µl), o tampão de eluição deve ser despejado no centro da membrana para eluição completa do RNA e DNA ligados.

O volume de eluição é flexível e pode ser adaptado de acordo com os requisitos da aplicação a jusante. Lembre-se de que o volume de eluato recuperado terá aproximadamente menos 5 µl do que o volume de tampão de eluição aplicado na coluna.

Controle de qualidade

De acordo com o sistema de gestão de qualidade com certificado ISO da QIAGEN, cada lote de QIAamp DSP Virus Spin Kit é testado com relação a especificações predeterminadas para garantir a qualidade consistente do produto.

Limitações

O desempenho do sistema foi estabelecido usando amostras de plasma e soro para isolamento de ácidos nucleicos virais.














É responsabilidade do usuário validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos usados em seu laboratório que não sejam abrangidos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.





Para minimizar o risco de um impacto negativo nos resultados do diagnóstico, deve-se utilizar os controles adequados para aplicações a jusante. Para validação adicional, recomendamos as diretrizes da Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos (ICH) em *ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (Validação de Procedimentos Analíticos: Texto e Metodologia).

Quaisquer resultados de diagnóstico gerados devem ser interpretados em conjunto com outros resultados clínicos ou laboratoriais.

Símbolos

Os seguintes símbolos podem aparecer nas instruções de uso ou na embalagem e na etiqueta:

Símbolo	Definição do símbolo
	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Consulte as instruções de uso
	Data de validade
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Número de referência
	Nota importante
	Número de lote
	Número do material (isto é, etiquetagem do componente)
	Componentes
	Volume
	Limites de temperatura
	Fabricante
	Na chegada

Símbolo	Definição do símbolo
	Abra na entrega; conserve as colunas QIAamp MinElute entre 2 e 8 °C
	Anote a data atual depois de adicionar etanol ao frasco
ADD	Adição
CONT	Contém
LYOPH	Liofilizado
RCNS	Reconstituir em
EtOH	Etanol
GuHCl	Cloridrato de guanidina
MALEIC ACID	Ácido maleico
SUBT	Subtilisina
GTIN	Número global de item comercial
→	Leva a
NUM	Número
Rn	R representa a revisão das Instruções de uso e n representa o número de revisão
	Conservar ao abrigo da luz solar
	Aviso/cuidado

Informações de contato

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico no site **www.qiagen.com/Support** (para obter as informações de contato, visite www.qiagen.com).

Apêndice

Manuseio de RNA

As ribonucleases (RNases) são enzimas muito estáveis e ativas que, geralmente, não precisam de cofatores para funcionar. Como as RNases são difíceis de desativar e uma quantidade mínima é suficiente para destruir o RNA, não use utensílios de plástico ou de vidro sem primeiro eliminar a possível contaminação por RNase. É necessário tomar cuidado para evitar a introdução inadvertida de RNases na amostra de RNA durante ou após o procedimento de isolamento. Para criar e manter um ambiente sem RNase, as seguintes precauções deverão ser tomadas durante o pré-tratamento e o uso de vasos e soluções descartáveis e não descartáveis ao trabalhar com RNA.

Manuseio geral

A técnica asséptica e microbiológica adequada deve sempre ser usada ao trabalhar com RNA. Partículas das mãos e de pó podem carregar bactérias e mofo e são as fontes mais comuns de contaminação por RNase. Sempre use luvas de látex ou vinil durante o manuseio de reagentes e amostras de RNA para evitar contaminações por RNase por superfície da pele ou por poeira do equipamento de laboratório. Troque as luvas com frequência e mantenha os tubos fechados.

Utensílios plásticos não descartáveis

Utensílios plásticos não descartáveis devem ser tratados, antes de serem usados, para garantir que não tenham RNase. Utensílios de plástico devem ser completamente lavados com NaOH 0,1 M, * 1 mM EDTA*, seguidos por água sem RNase* (consulte "Soluções", na página 36). Como alternativa, utensílios de plástico resistentes ao clorofórmio podem ser lavados com clorofórmio* para desativar as RNases.

* Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (safety data sheets, SDSs) apropriadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Utensílios de vidro

Utensílios de vidro devem ser tratados antes de serem usados para garantir que não tenham RNase. Utensílios de vidro usados para trabalhar com RNA devem ser limpos com detergente, completamente lavados e colocados no forno a >240 °C por quatro horas ou mais (durante a noite, se for mais conveniente) antes de serem usados. Apenas colocar na autoclave não vai desativar completamente muitas RNases. O cozimento no forno desativará as ribonucleases e garantirá que nenhum outro ácido nucleico (como o DNA plasmídeo) permaneça na superfície dos utensílios de vidro. Como alternativa, os utensílios de vidro podem ser tratados com DEPC* (pirocarbonato dietílico). Cubra o utensílio de vidro com DEPC 0,1% em água durante a noite (12 horas) a 37 °C e, depois, coloque na autoclave ou aqueça a 100 °C durante 15 minutos para eliminar o DEPC residual.



Tubos Corex® devem ficar livres de RNase por tratamento com DEPC e não por cozimento. Isso reduzirá a taxa de falha desse tipo de tubo durante a centrifugação.

Tanques de eletroforese

Os tanques de eletroforese devem ser limpos com solução detergente (por ex., SDS 0,5%), * enxaguados com água, secos com etanol*[†] e preenchidos com uma solução de peróxido de hidrogênio a 3%.* Após 10 minutos à temperatura ambiente, os tanques de eletroforese devem ser enxaguados completamente com água sem RNase.

Soluções

As soluções (água e outras soluções) devem ser tratadas com 0,1% O DEPC. O DEPC reagirá com as aminas primárias e não pode ser usado diretamente para tratar soluções tampão Tris. O DEPC é altamente instável na presença de soluções tampão Tris e se decompõe rapidamente em etanol e CO₂. Ao preparar soluções tampão Tris, trate a água com DEPC primeiro e, depois, dissolva o Tris, para fazer a solução tampão adequada.

* Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (safety data sheets, SDSs) apropriadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

[†] Contém azida de sódio como conservante.

DEPC é um inibidor forte, mas não absoluto, de RNases. É comumente usado a uma concentração de 0,1%, para desativar as RNases em utensílios de vidro ou de plástico ou para criar soluções e água sem RNase. O DEPC desativa as RNases por modificação covalente. Traços de DEPC modificarão os resíduos de purina no RNA por carbotoxilação. O RNA carbotoxilado é convertido com muito pouca eficiência em sistemas sem células. No entanto, sua habilidade de formar híbridos DNA:RNA ou RNA:RNA não é gravemente afetada, a menos que uma grande fração dos resíduos de purina tenham sido modificados. O DEPC residual deve sempre ser removido de soluções ou vasos colocando na autoclave ou aquecendo a $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos \pm 1 minuto.

Adicione 0,1 ml de DEPC a 100 ml da solução a ser tratada e agite vigorosamente para misturar o DEPC na solução ou deixe incubar por >12 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Coloque na autoclave por 15 minutos \pm 1 minuto para remover qualquer vestígio de DEPC. Poderá ser pertinente testar as fontes de água quanto à presença de RNases contaminantes, pois muitas fontes de água destilada são livres de atividade de RNase.



Os tampões do QIAamp DSP Virus Spin Kit não ficam livres de RNase pelo tratamento com DEPC e, portanto, não estão livres de contaminação com DEPC.

Informações para pedidos

Produto	Conteúdo	N° de ref.
QIAamp DSP Virus Spin Kit (50)	Para 50 preparos: QIAamp Mini Spin Columns, tampões, reagentes, tubos, VacConnectors	61704
Produtos relacionados		
QIAcube Connect MDx*	Instrumento e 1 ano de garantia em peças e mão de obra	9003070
Acessórios		
Rotor Adapters	Para 240 preparos: 240 adaptadores de rotor descartáveis e 240 tubos de eluição (1,5 ml); para uso com o QIAcube	990394
Rotor Adapter Holder	Suporte para 12 adaptadores de rotor descartáveis; para uso com o QIAcube	990392
Sample Tubes CB	1000 tubos cônicos com tampa rosqueada sem base contornada (2 ml) para uso com o QIAcube e QIAcube Connect	990382
Shaker Rack Plugs	Para carregar o rack do agitador do QIAcube	9017854
Reagent Bottles, 30 ml	Frascos de reagente (30 ml) com tampas; embalagem de 6; para uso com o QIAcube	990393
Filter-Tips, 1000 µl	Ponteiras com filtro descartáveis, no rack; [8 x 128]. Para uso com o QIAcube	990352

Produto	Conteúdo	N° de ref.
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore	Ponteiras com filtro descartáveis, orifício largo, no rack; (8 x 128); não são necessárias para todos os protocolos. Para uso com o QIAcube	990452
Filter-Tips, 200 µl	Ponteiras com filtro descartáveis, no rack; (8 x 128). Para uso com os instrumentos QIAcube e o QIASymphony SP/AS	990332

* O QIAcube Connect MDx não está disponível em todos os países. Para obter mais detalhes, entre em contato com a assistência técnica da QIAGEN.

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual do kit QIAGEN correspondente. Os manuais do usuário e os manuais de kits QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Histórico de revisões do documento

Revisão	Descrição
R7, 01/2021	<p>As seguintes seções foram atualizadas: "Purificação automatizada de ácidos nucleicos virais no QIAcube ou no QIAcube Connect MDx", "Materiais necessários, mas não fornecidos", "Avisos e precauções", "Protocolo: Purificação de ácidos nucleicos virais de plasma ou soro usando uma microcentrífuga ou o QIAcube/QIAcube Connect MDx", "Símbolos" e "Informações para pedidos".</p> <p>As seções "Características de desempenho" e "Referências" foram removidas.</p> <p>Uma nova figura foi inserida (imagem do QIAcube Connect MDx).</p> <p>Foram adicionadas referências para o QIAcube Connect MDx e os seus acessórios.</p> <p>Alterações de layout e editoriais.</p>

Contrato de licença limitada para o QIAamp DSP Virus Spin Kit

O uso deste produto implica a aceitação, por parte de qualquer comprador ou usuário do produto, com os seguintes termos:

1. O produto só pode ser usado conforme os protocolos facultados com o mesmo e este manual e apenas com componentes contidos no painel. A QIAGEN não concede licença a qualquer uma de suas propriedades intelectuais para usar ou incorporar os componentes incluídos neste painel com quaisquer componentes não incluídos no mesmo, exceto conforme descrito nos protocolos facultados com o produto, neste manual e nos protocolos adicionais, disponíveis em www.qiagen.com. Alguns desses protocolos adicionais foram fornecidos pelos usuários da QIAGEN para os usuários da QIAGEN. Esses protocolos não foram testados por completo nem otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não garante nem fornece garantias de que eles não infringem os direitos de terceiros.
2. A não ser em relação às licenças expressamente indicadas, a QIAGEN não garante que este painel e/ou seu(s) uso(s) não infringem os direitos de terceiros.
3. Este painel e seus componentes estão licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconstruídos ou revendidos.
4. A QIAGEN especificamente renuncia a quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, com exceção daquelas expressamente indicadas.
5. O comprador e o usuário do painel concordam em não realizar nem permitir que outra pessoa realize qualquer etapa que possa levar a ou facilitar qualquer um dos atos proibidos acima. A QIAGEN poderá fazer cumprir as proibições deste Acordo de licença exclusivo em qualquer tribunal e recuperar todas as custas processuais, incluindo os encargos com os advogados, em qualquer ação para fazer cumprir o Acordo de licença exclusivo ou quaisquer direitos de propriedade intelectual relacionados com o painel e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite www.qiagen.com.

Marcas registradas: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, MinElute® (QIAGEN Group); Corex® (Corning, Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co.). Os nomes registrados, marcas registradas etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.

01/2021 HB-0417-007 1122785 © 2021 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Assistência Técnica support.qiagen.com | Site www.qiagen.com