

# Návod na použitie (Príručka) súpravy QIAamp<sup>®</sup> DSP Virus Kit



Verzia 2



Na diagnostické použitie in vitro

Na použitie so súpravou QIAamp<sup>®</sup> DSP Virus Kit



60704



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NEMECKO



1127541SK

# Obsah

Zamýšľané použitie .....	4
Zamýšľaný používateľ .....	4
Popis a princíp.....	5
Lýza s proteázou QIAGEN Protease (QP) .....	5
Adsorpcia na membránu QIAamp MinElute .....	5
Odstránenie zvyškových kontaminantov .....	5
Elúcia vírusových nukleových kyselín .....	6
Výťažok a kvalita vírusových nukleových kyselín.....	6
Doplnenie interných kontrolných roztokov.....	7
Súhrn a vysvetlenie.....	9
Dodávané materiály .....	10
Obsah súpravy .....	10
Súčasti súpravy.....	11
Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú.....	12
Doplňkové reagenty .....	12
Spotrebný materiál .....	12
Zariadenie .....	12
Varovania a preventívne opatrenia.....	13
Bezpečnostné informácie .....	13
Núdzové informácie .....	14
Preventívne opatrenia .....	15
Likvidácia .....	16

Skladovanie a manipulácia s reagensiami.....	17
Stabilita pri používaní.....	17
Odber a skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi.....	19
Dôležité poznámky.....	21
Dôležité body pred začatím činnosti.....	21
Manipulácia s kolónami QIAamp MinElute.....	22
Príprava reagensí a pufrov.....	22
Nastavenie vákuového systému QIAvac 24 Plus.....	27
Protokol: Izolácia a purifikácia vírusových nukleových kyselín z plazmy a séra.....	29
Kontrola kvality.....	33
Obmedzenia.....	34
Charakteristiky účinnosti.....	35
Spríevodca riešením problémov.....	36
Symboly.....	41
Príloha.....	44
Informácie o objednávaní.....	45
História úprav dokumentu.....	46

## Zamýšľané použitie

Súprava QIAamp® DSP Virus Kit je určená na manuálnu izoláciu a purifikáciu vírusových nukleových kyselín zo vzoriek ľudskej plazmy alebo séra.

Súprava QIAamp DSP Virus Kit využíva technológiu membrány z oxidu kremičitého (technológiu QIAamp) na izoláciu a purifikáciu vírusových nukleových kyselín zo vzoriek ľudskej plazmy alebo séra.

Tento produkt je určený na diagnostické použitie in-vitro a použitie profesionálnymi používateľmi, ako sú technici a lekári vyškolení v technikách molekulárnej biológie.

## Zamýšľaný používateľ

Produkt je určený na použitie profesionálnymi používateľmi, ako sú technici a lekári vyškolení v technikách molekulárnej biológie.

## Popis a princíp

Postup QIAamp DSP Virus pozostáva zo 4 krokov (lýza, viazanie, premytie a elúcia) a vykonáva sa pomocou kolón QIAamp MinElute®, vákuového potrubia a štandardnej mikrocentrifúgy. Postup je navrhnutý tak, aby sa minimalizovala možnosť krížovej kontaminácie medzi vzorkami a aby sa umožnila bezpečná manipulácia s potenciálne infekčnými vzorkami. Jednoduchý postup QIAamp DSP Virus je vhodný na súčasné spracovanie viacerých vzoriek. Súpravu QIAamp DSP Virus Kit je možné použiť na izoláciu vírusovej RNA a DNA zo širokej škály RNA a DNA vírusov. Avšak výkonnosť charakteristiky pre všetky druhy vírusov neboli stanovené a používateľ ich musí overiť.

### Lýza s proteázou QIAGEN Protease (QP)

Vzorky sa lyzujú za denaturačných podmienok pri zvýšených teplotách. Lýza sa vykonáva v prítomnosti proteázy QIAGEN Protease (QP) a lyzačného pufru (AL), ktoré spoločne zabezpečujú inaktiváciu RNáz.

### Adsorpcia na membránu QIAamp MinElute

Podmienky viazania sa upravujú pridaním etanolu, aby sa umožnilo optimálne viazanie vírusovej RNA a DNA na membránu. Lyzáty sa potom prenášajú na kolónu QIAamp MinElute a vírusové nukleové kyseliny sa adsorbujú na membránu z gélu oxidu kremičitého, keď sa lyzát cez ňu ťahá tlakom vákua. Podmienky týkajúce sa soli a pH zabezpečujú, že sa na membráne QIAamp MinElute nezachytia bielkoviny a iné kontaminanty, ktoré môžu inhibovať PCR a ďalšie následné enzymatické reakcie.

### Odstránenie zvyškových kontaminantov

Nukleové kyseliny zostávajú naviazané na membránu, zatiaľ čo kontaminanty sa účinne odplavia počas 3 premývacích krokov.

## Elúcia vírusových nukleových kyselín

V jednom kroku sa veľmi čistá vírusová RNA a DNA eluuje z membrány kolóny QIAamp MinElute v elučnom pufrí (AVE) ekvilibrovanom na izbovú teplotu. Kolóny QIAamp MinElute umožňujú elučné objemy 20 µl alebo 60 µl. Pre následné aplikácie, ktoré vyžadujú malé počiatkové objemy (napr. niektoré testy PCR a RT-PCR), môže použitie vírusových nukleových kyselín eluovaných v 20 µl elučného pufru (AVE) zvýšiť citlivosť testu.

Pre následné aplikácie, ktoré vyžadujú väčší počiatkový objem, je možné zvýšiť elučný objem až na 60 µl. Zvýšenie elučného objemu však zníži koncentráciu nukleových kyselín v eluáte.

Vzhľadom na zvyšný elučný pufer zadržaný membránou centrifugačnej kolóny po centrifugácii môže byť objem získaného eluátu nižší ako objem elučného pufru aplikovaného na kolónu. Okrem toho objem regenerovaného eluátu závisí od povahy vzorky.

Eluované vírusové nukleové kyseliny sa zhromažďujú v elučných skúmavkách (ET) a môžu sa skladovať pri teplote 2 – 8 °C až 24 hodín. Pri dlhodobom skladovaní dlhšom ako 24 hodín, odporúčame skladovanie purifikovaných nukleových kyselín pri teplote -20 °C.

**Poznámka:** Stabilita eluátu vo veľkej miere závisí od rôznych faktorov a súvisí s konkrétnou následnou aplikáciou. Bola vyhodnotená pre súpravu QIAamp DSP Virus Kit v spojení s príkladnými následnými aplikáciami. Používateľ je zodpovedný za to, aby si preštudoval návod na použitie konkrétnej následnej aplikácie, ktorá sa používa v jeho laboratóriu a/alebo overil celý pracovný postup s cieľom stanoviť vhodné podmienky skladovania.

## Výťažok a kvalita vírusových nukleových kyselín

Výťažky vírusovej nukleovej kyseliny izolovanej z biologických vzoriek sú štandardne nižšie ako 1 µg. Na stanovenie výťažkov sa odporúčajú metódy kvantitatívnej amplifikácie. Pri kvantifikácii nukleových kyselín izolovaných pomocou protokolu QIAamp DSP Virus pamätajte na to, že vo vzorke bude podstatne viac nosnej RNA ako vírusovej RNA.

Nosná RNA slúži na dva účely: Po prvé, zvyšuje väzbu vírusových nukleových kyselín na membránu QIAamp, najmä ak je vo vzorke veľmi málo cieľových molekúl. Po druhé, pridanie veľkého množstva nosnej RNA znižuje riziko degradácie vírusovej RNA v zriedkavých prípadoch, keď molekuly RNázy uniknú z denaturácie chaotropnými soľami a detergentom v lyzačnom pufrí (AL). Ak sa nosná RNA nepridá do lyzačného pufru (AL), môže to viesť k zníženiu výťažku vírusovej RNA alebo DNA.

Nosná RNA môže byť tiež zahrnutá v niektorých reagenziách internej kontroly komerčných následných testov. V týchto prípadoch si prečítajte príslušný návod na použitie od výrobcu následného testu.

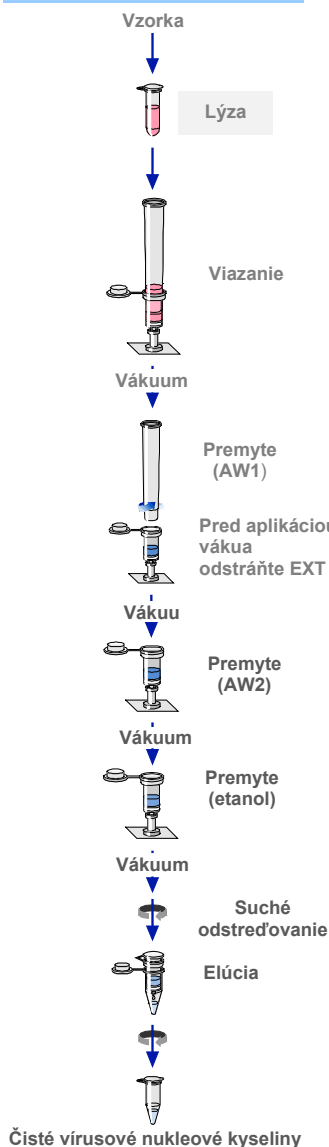
Účinnosť rôznych amplifikačných systémov sa líši v závislosti od celkového množstva nukleových kyselín prítomných v reakcii. Eluáty z tejto súpravy obsahujú vírusové nukleové kyseliny aj nosnú RNA, pričom množstvo nosnej RNA výrazne prevyšuje množstvo vírusových nukleových kyselín. Výpočty množstva eluátu, ktoré sa má pridať k následným amplifikáciám, by preto mali zohľadňovať množstvo pridanej nosnej RNA. Na získanie najvyšších možných úrovní citlivosti v amplifikačných reakciách bude možno potrebné upraviť množstvo nosnej RNA pridanej do lyzačného pufru (AL).

## Doplnenie interných kontrolných roztokov

Používanie protokolu QIAamp DSP Virus v kombinácii s komerčne dostupnými amplifikačnými systémami si môže vyžadovať zavedenie internej kontroly do purifikačného postupu. Interná kontrolná RNA alebo DNA by sa mala pridať do lyzačného pufru spolu s nosnou RNA. Pre optimálnu účinnosť čistenia by molekuly internej kontroly mali byť dlhšie ako 200 nukleotidov, pretože nedôjde k účinnej regenerácii menších molekúl.

Na stanovenie optimálnej koncentrácie si pozrite pokyny výrobcu. Použitie inej ako odporúčanej koncentrácie môže znížiť účinnosť amplifikácie.

## Postup QIAamp DSP Virus



**Pred začatím si pozorne prečítajte protokol (strana 29).**

Do LT pridajte 75 µl QP, 500 µl vzorku a 500 µl AL.

Vírivo miešajte 15 sekúnd.

Inkubujte 15 minúty pri 56 °C.

Pridajte 600 µl etanolu.

Vírivo miešajte 15 sekúnd.

Inkubujte 5 min pri izbovej teplote (15 – 25 °C).

Preneste lyzát do kolóny QIAamp MinElute s pripojeným EXT.

Pridajte 600 µl rekonštituovaného AW1.

Odstráňte EXT.

Pridajte 750 µl rekonštituovaného AW2.

Pridajte 750 µl etanolu.

Umiestnite kolónu QIAamp MinElute do WT.

Odstredujte 1 minútu pri 14 000 ot./min.

Umiestnite kolónu QIAamp MinElute do WT.

Inkubujte 3 minúty pri 56 °C.

Umiestnite kolónu QIAamp MinElute do ET.

Pridajte 20 µl alebo 60 µl AVE.

Inkubujte 3 minúty pri izbovej teplote.

Odstredujte 1 minútu pri 14 000 ot./min.



## Súhrn a vysvetlenie

Súprava QIAamp DSP Virus Kit používa osvedčenú technológiu na súčasnú izoláciu a purifikáciu vírusovej DNA a RNA. Postup QIAamp DSP Virus kombinuje selektívne väzobné vlastnosti membrány na báze oxidu kremičitého s minimálnymi elučnými objemami 20 µl alebo 60 µl.


Postup je vhodný na použitie s plazmou alebo sérom; oboje môže obsahovať citrát alebo EDTA. Vzorky môžu byť čerstvé, lyofilizované alebo zmrazené, pokiaľ neboli zmrazené a rozmrazené viac než raz.

Pri vákuovom postupe sa na protokol vyžaduje vákuové potrubie (napr. QIAvac 24 Plus s pripájacím systémom QIAvac Connecting System) a vákuové čerpadlo schopné vytvoriť vákuum ~800 – 900 mbar (napr. vákuové čerpadlo QIAGEN® Vacuum Pump). Na jednoduché monitorovanie vákuového tlaku a pohodlné uvoľňovanie vákua by sa mal používať vákuový regulátor Vacuum Regulator (súčasť pripájacieho systému QIAvac Connecting System).

Postup je možné použiť na izoláciu vírusovej RNA a DNA zo širokej škály RNA a DNA vírusov. Postup je navrhnutý tak, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii medzi vzorkami a aby sa umožnila bezpečná manipulácia s potenciálne infekčnými vzorkami. Postup je veľmi vhodný na súčasné spracovanie viacerých vzoriek. Vírusové nukleové kyseliny sa eluujú v elučnom pufri (AVE), sú pripravené na použitie pri amplifikačných reakciách alebo sa skladujú pri teplote -20 °C na neskoršie použitie.

# Dodávané materiály

## Obsah súpravy

QIAamp DSP Virus				60704
Katalógové č.				50
Počet príprav				
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (kolóny QIAamp MinElute s premývacími skúmavkami) (WT) (2 ml)	COL		50
EXT	Column Extenders (Nadstavce kolón) (3 ml)	COL EXT		50
ET	Elution Tubes (Elučné skúmavky) (1,5 ml)	ELU TUBE		50
VC	VacConnectors	VAC CON		50
LT	Lysis Tubes (Lyzačné skúmavky) (2 ml)	LYS TUBE		50
WT	Wash Tubes (WT)s (Premývacie skúmavky) (2 ml)	WASH TUBE		50
AL	Lysis Buffer (Lyzačný pufer)*	LYS BUF		33 ml
AW1	Wash Buffer 1 (AW1)* (Premývaci pufer 1 (AW1)) (koncentrát)	WASH BUF 1 CON		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (AW2)† (Premývaci pufer 2 (AW2)) (koncentrát)	WASH BUF 2 CON		13 ml
AVE	Elution Buffer† (Elučný pufer) (purpurové viečka)	ELU BUF		4 × 2 ml
PS	Protease Solvent† (Rozpúšťadlo proteázy)	QPROT SOLV		4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (Nosná RNA) (červené viečka)	CAR RNA		310
QP	QIAGEN® Protease‡ (Proteáza)	QPROT		1 liekovka
–	Návod na použitie (Príručka)			1

\* Obsahuje hydrochlorid guanidínu. Nekompatibilné s dezinfekčnými prostriedkami obsahujúcimi bielidlo. Na strane 13 nájdete bezpečnostné informácie.

† Obsahuje azid sodný ako konzervačnú látku

‡ Objem resuspenzie 4,4 ml

## Súčasti súpravy

Hlavné komponenty súpravy, ktoré obsahujú účinné látky, sú vysvetlené nižšie.

Reagencia	Účinné látky	Koncentrácia (w/w) (%)
Proteáza QIAGEN Protease (QP)	Subtilizín	≥ 90 až ≤ 100
AL	Hydrochlorid guanidínu Kyselina maleinová	≥ 30 až < 50 ≥ 0,1 až < 1
AW!	Hydrochlorid guanidínu	≥ 50 až < 70

# Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

## Doplnkové reagensie

- Etanol (96 – 100 %)\*

## Spotrebný materiál

- Pipety† a pipetové hroty (aby sa zabránilo krížovej kontaminácii, dôrazne odporúčame používanie pipetových hrotov s aerosólovými bariérami)
- Jednorazové rukavice

## Zariadenie

- Ohrievacie teleso† na lýzu vzoriek pri teplote 56 °C pre testovacie mikroskúmavky s objemom 2,0 ml
- Mikrocentrifúga†
- Odmerný valec (50 ml)
- Vortex
- Vákuový systém QIAvac 24 Plus (kat. č. 19413) alebo ekvivalentný†

\* Nepoužívajte denaturovaný alkohol, ktorý obsahuje ďalšie látky, ako je metanol alebo metylketón.  
†Pred použitím zabezpečte, aby sa prístroje skontrolovali a nakalibrovali podľa odporúčaní výrobcu.

## Varovania a preventívne opatrenia

Vezmite na vedomie, že môžete byť požiadaní, aby ste si naštudovali miestne nariadenia pre nahlasovanie vážnych incidentov, ktoré vznikli v súvislosti s pomôckou. výrobcovi a/alebo jeho oprávnenému zástupcovi a regulačnému orgánu, ku ktorému používateľ a/alebo pacient prináleží.

Na diagnostické použitie in vitro.

Pred použitím súpravy si dôkladne prečítajte všetky pokyny.

### Bezpečnostné informácie

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii online v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Na tejto adrese môžete vyhľadať, zobraziť a vytlačiť kartu bezpečnostných údajov (KBÚ) pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.



**UPOZORNENIE:** Nepri dávajte bieliace alebo kyslé roztoky do odpadu z prípravy vzoriek.

- Lyžačný pufer (AL) a premývací pufer 1 (AW1) obsahujú hydrochlorid guanidínu, ktorý môže v kombinácii s bielidlom vytvárať vysoko reaktívne zlúčeniny. Ak dôjde k rozliatiu kvapaliny obsahujúcej tieto pufré, vyčistite ju vhodným laboratórnym čistiacim prostriedkom a vodou. Ak rozliata kvapalina obsahuje potenciálne infekčné činidlá, vyčistite postihnuté miesto najskôr laboratórnym čistiacim prostriedkom a vodou a potom 1% (v/v) chlórnanom sodným.

- Ak sú fľaše s pufrom poškodené alebo netesnia, pri likvidácii fliaš používajte rukavice a ochranné okuliare, aby ste predišli poraneniu seba alebo iných osôb.
- Spoločnosť QIAGEN netestovala kvapalnú odpad generovaný postupom QIAamp DSP Virus na zvyškové infekčné materiály. Pri práci s týmto výrobkom sa preto musia dodržiavať všeobecné preventívne opatrenia (rukavice, laboratórne plášte a ochrana očí) pre zaobchádzanie s potenciálne infekčným materiálom z ľudského zdroja. Tekutý odpad musí byť považovaný za infekčný a manipulácia s ním a jeho likvidácia musí prebiehať v súlade s miestnymi bezpečnostnými predpismi.
- Vzorky sú potenciálne infekčné. Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných postupov.

## Núdzové informácie

CHEMTREC

USA a Kanada 1-800-424-9300

Mimo USA a Kanada +1-703-527-3887

## Preventívne opatrenia

Na súčasti súpravy QIAamp DSP Virus Kit sa vzťahujú nasledujúce bezpečnostné vyhlásenia a preventívne opatrenia.

### Lysis Buffer (AL)



Obsahuje: hydrochlorid guanidínu; kyselina maleinová. Varovanie! Môže byť škodlivé po požití alebo vdýchnutí. Spôsobuje podráždenie pokožky. Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu. Spôsobuje závažné podráždenie očí. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. Ak sa necítite dobre, volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára. Ak sa prejaví podráždenie pokožky alebo sa vytvorí vyrážky: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť. Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte. Obsah/obal zlikvidujte v schválenom zariadení na zber a likvidáciu odpadov.

### Wash Buffer 1 (AW1)



Obsahuje: hydrochlorid guanidínu. Varovanie! Škodlivé po požití alebo vdýchnutí. Spôsobuje podráždenie pokožky. Spôsobuje závažné podráždenie očí. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte. Obsah/obal zlikvidujte v schválenom zariadení na zber a likvidáciu odpadov.

### QIAGEN Protease (QP)



Obsahuje: subtilizín. Nebezpečenstvo! Škodlivý po požití. Spôsobuje podráždenie pokožky. Spôsobuje závažné poškodenie očí. Pri vdýchnutí môže vyvolať alergiu alebo príznaky astmy alebo dýchacie ťažkosti. Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest. Vyhnite sa vdychovaniu prachu/dymu/plynu/oparu/pár/aerosólov. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. Používajte respiračnú ochranu. PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. PO expozícii alebo podozrení z nej: Okamžite volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára. Premiestnite osobu na čerstvý vzduch a nechajte ju pohodlne dýchať.

## Likvidácia

Odpad obsahuje vzorky a reagenty. Tento odpad môže obsahovať toxické alebo infekčné materiály a musí byť riadne zlikvidovaný. Pri likvidácii postupujte v súlade s miestnymi bezpečnostnými predpismi.

Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii online vo formáte PDF na adrese [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kde môžete vyhľadať, zobrazit' a vytlačiť KBÚ pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.



# Skladovanie a manipulácia s reagensiami

Pozornosť by sa mala venovať dátumom expirácie a podmienkam skladovania vytlačeným na škatuli a štítkoch všetkých komponentov. Nepoužívajte exspirované alebo nesprávne skladované komponenty.

Kolóny QIAamp MinElute by sa mali po príchode skladovať pri teplote 2 – 8 °C. Pri správnom skladovaní sú kolóny QIAamp MinElute stabilné až do dátumu expirácie uvedeného na škatuli súpravy.

**Poznámka:** S cieľom zabezpečiť, aby sa komponenty z rôznych súprav nezmiešali, označte kolóny QIAamp MinElute príslušným číslom šarže súpravy.

Všetky pufre možno skladovať pri izbovej teplote (15 – 25 °C) do dátumu expirácie uvedeného na škatuli súpravy.

Lyofilizovaná nosná RNA sa môže skladovať pri izbovej teplote do dátumu expirácie uvedeného na škatuli súpravy.

Lyofilizovaná proteáza QIAGEN Protease (QP) sa môže skladovať pri izbovej teplote do dátumu expirácie uvedeného na škatuli.

## Stabilita pri používaní

Nosná RNA môže byť rozpustená iba v elučnom puffri (AVE); rozpustená nosná RNA sa musí okamžite pridať do lyzačného puffra (AL), ako je uvedené na strane 23. Tento roztok sa musí pripraviť čerstvý a je stabilný pri teplote 2 – 8 °C po dobu až 48 hodín. Nepoužitá časť nosnej RNA rozpustenej v elučnom puffri (AVE) sa musia zmraziť v alikvotných podieloch pri -20 °C.

Pripravená proteáza QIAGEN Protease (QP) v rozpúšťadle proteázy (PS) je stabilná až 1 rok pri skladovaní pri teplote 2 – 8 °C, ale iba do dátumu expirácie. Je potrebné vyhnúť sa dlhodobému skladovaniu zásobného roztoku proteázy QIAGEN Protease (QP) pri izbovej teplote.

Rekonštituovaný premývací pufer 1 (AW1) a rekonštituovaný premývací pufer 2 (AW2) sú stabilné až 1 rok pri skladovaní pri izbovej teplote, ale iba do dátumu expirácie uvedeného na škatuli súpravy.

# Odber a skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi

**Poznámka:** Stabilita vzorky vo veľkej miere závisí od rôznych faktorov a súvisí s konkrétnou následnou aplikáciou. Bola vyhodnotená v spojení s príkladnými následnými aplikáciami. Používateľ je zodpovedný za to, aby si preštudoval návod na použitie konkrétnej následnej aplikácie, ktorá sa používa v jeho laboratóriu a/alebo overil celý pracovný postup s cieľom stanoviť vhodné podmienky skladovania.

Všeobecné odporúčania na odber, prepravu a skladovanie nájdete v schválenom usmernení CLSI MM13-A Odber, preprava, príprava a skladovanie vzoriek na molekulárne metódy. Okrem toho sa pri príprave, skladovaní, preprave vzoriek a všeobecnej manipulácii s nimi musia dodržiavať pokyny výrobcu vybraného zariadenia na odber vzoriek.


Proces purifikácie je optimalizovaný pre použitie so vzorkami ľudskej plazmy a séra. Na prípravu plazmy sa môžu použiť vzorky krvi upravované EDTA alebo citrátom ako antikoagulantom. Vzorky môžu byť čerstvé alebo zmrazené, pokiaľ neboli zmrazené a rozmrazené viac než raz. Rozmrazené zmrazené vzorky mierne rozmiešajte, aby ste zaistili dôkladné premiešanie.

Po odbere a odstredení sa môže plazma alebo sérum skladovať pri teplote 2 – 8 °C až 6 hodín. Pri dlhodobom skladovaní sa odporúča zmrazenie na teplotu -80 °C až -20 °C v alikvótach. Zmrazené vzorky plazmy alebo séra sa nesmú rozmraziť viac než raz. Opakované zmrazovanie a rozmrazovanie vedie k denaturácii a zrážaniu bielkovín, čo má za následok redukciu vírusových titrov, a tým znížené výťažky vírusových nukleových kyselín. Kryoprecipitáty vytvorené počas zmrazovania a rozmrazovania navyše upchajú membránu kolóny QIAamp MinElute. Ak sú kryoprecipitáty viditeľné, mali by sa granulovať odstredením pri približne 6 800 x g po dobu 3 minút. Vyčistený supernatant by sa mal odsáť a okamžite spracovať bez narušenia granule. Okamžite spustíte postup purifikácie. Odstredovanie pri nízkych silách g neznižuje vírusové titre.

**Poznámka:** Podľa príkladných interferenčných štúdií pre súpravu QIAamp DSP Virus Kit a v súlade s normou ISO 20186-2:2019(E) môže heparín zo skúmaviek na odber krvi ovplyvniť čistotu izolovaných nukleových kyselín a prípadný prenos do eluátov môže v niektorých následných aplikáciách spôsobiť inhibície. Preto odporúčame používať vzorky krvi ošetrené EDTA alebo citrátom ako antikoagulantom.

# Dôležité poznámky

## Dôležité body pred začatím činnosti

- Po prijatí súpravy skontrolujte, či komponenty súpravy nie sú poškodené. Ak sú blistre alebo fľaše s pufrom poškodené, kontaktujte technický servis spoločnosti QIAGEN alebo miestneho distribútora. V prípade rozliatia kvapaliny pozri „Varovania a preventívne opatrenia“ (strana 13). Nepoužívajte poškodené komponenty súpravy, pretože ich použitie môže viesť k zhoršenému fungovaniu súpravy.
- Vždy používajte vybavenie bez RNázy.
- Medzi prenosmi kvapaliny vždy vymeňte špičky pipety. Aby sa minimalizovalo riziko krížovej kontaminácie, odporúčame použiť pipetové hroty s aerosólovou bariérou.
- Vždy používajte jednorazové rukavice a pravidelne kontrolujte, či nie sú kontaminované materiálom vzorky.
- Rukavice zlikvidujte, ak sú kontaminované, a minimálne pri všetkých krokoch označených symbolom rukavíc. 
- Aby sa minimalizovalo riziko krížovej kontaminácie, otvárajte vždy iba jednu skúmavku.
- Po všetkých krokoch pulzného vortexovania mikrocentrifugačné skúmavky chvíľu odstredíte, aby sa odstránili kvapky z vnútornej strany viečka.
- Všetky kroky odstredovania sa uskutočňujú pri izbovej teplote (15 – 25 °C).
- Používateľ by mal zabezpečiť, aby sa počas celého postupu zachovala sledovateľnosť vzoriek.
- So súpravou, ktorú práve používate, nepoužívajte komponenty súpravy z iných súprav, ak nie sú čísla šarží rovnaké.
- Zabráňte mikrobiálnej kontaminácii reagensov súpravy.
- Na minimalizáciu rizika infekcie z potenciálne infekčného materiálu odporúčame pracovať v podmienkach laminárneho prúdenia vzduchu až do ukončenia lýzy vzoriek.
- Postup obsahuje pokyny na spracovanie jednej vzorky plazmy alebo séra. Na vákuovom systéme QIAvac 24 Plus je však možné súčasne spracovať až 24 vzoriek.
- Túto súpravu smie používať iba personál vyškolený v diagnostickej laboratórnej praxi in vitro.

## Manipulácia s kolónami QIAamp MinElute

Z dôvodu citlivosti technológií amplifikácie nukleových kyselín sú pri manipulácii s kolónami QIAamp MinElute potrebné nasledujúce preventívne opatrenia, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii medzi prípravami vzoriek:

- Opatrne naneste vzorku alebo roztok na kolóny QIAamp MinElute. Napipetujte vzorku do kolóny QIAamp MinElute bez navlhčenia okraja kolóny.
- Medzi jednotlivými prenosmi kvapaliny vždy vymeňte špičky pipety. Odporúča sa použitie pipetových hrotov s aerosólovou bariérou.
- Nedotýkajte sa membrány QIAamp MinElute pipetovým hrotom.
- Naraz otvárajte iba jedna kolóna QIAamp MinElute a dajte pozor, aby sa zabránilo tvorbe aerosólov.

## Príprava reagensí a pufrov

### Príprava RNA

Pri príprave vírusovej RNA pracujte rýchlo počas manuálnych krokov postupu a pred začatím si prečítajte časť Príloha na strane 44.

### Príprava proteázy QIAGEN Protease (QP)

Pridajte celý obsah liekovky obsahujúcej 4,4 ml rozpúšťadla proteázy (PS) do liekovky s lyofilizovanou proteázou QIAGEN Protease (QP) a opatrne premiešajte. Aby ste zabránili peneniu, pri miešaní liekovku niekoľkokrát prevráťte. Skontrolujte, či je proteáza QIAGEN Protease (QP) úplne rozpustená.



Nepřidávajte proteázu QIAGEN Protease (QP) priamo do lyzačného pufru (AL)\*.

\* Obsahuje chaotropnú soľ. Prijmite príslušné laboratórne bezpečnostné opatrenia a pri manipulácii používajte rukavice. Nekompatibilné s dezinfekčnými prostriedkami obsahujúcimi bielidlo. Na strane 14 nájdete bezpečnostné informácie.

## Pridanie nosnej RNA a internej kontroly do lyzačného pufru (AL)\*

Pri použití súpravy QIAamp DSP Virus Kit v kombinácii s diagnostickými amplifikačnými systémami sa dôrazne odporúča použitie internej kontroly. Ďalšie informácie nájdete v pokynoch výrobcov. Interná kontrola a rekonštituovaná nosná RNA by sa mali pridať do lyzačného pufru (AL) a jemne premiešať prevrátením skúmavky 10-krát. Aby ste zabránili peneniu, nemiešajte vírivo. Ak používate vnútornú kontrolu, primerane znížte objem lyzačného pufru (AL) (ďalšie podrobnosti nájdete v tabuľke 1).

Na stanovenie optimálnej koncentrácie internej kontroly si pozrite pokyny výrobcu. Použitie inej ako odporúčanej koncentrácie môže mať za následok nesprávne výsledky. Pri výpočte správneho množstva použitej internej kontroly berte do úvahy počiatočný objem vzorky a elučný objem. Pamätajte, že súprava QIAamp DSP Virus Kit používa počiatočný objem vzorky 500 µl.

Na prípravu roztoku nosnej RNA pridajte 310 µl elučného pufru (AVE) do skúmavky obsahujúcej 310 µg lyofilizovanej nosnej RNA, aby ste získali roztok 1 µg/µl. Nosnú RNA dôkladne rozpustíte, rozdeľte ju na alikvóty vhodnej veľkosti a uskladnite pri teplote -20 °C. Alikvóty nosnej RNA nezmrazujte a nerozmrazujte viac ako 3-krát.



Nosná RNA sa nerozpúšťa v lyzačnom pufri (AL). Musí sa najskôr rozpustiť v elučnom pufri (AVE) a potom pridať do lyzačného pufru (AL). Pred zmiešaním s lyzačným pufrom (AL) sa uistite, že je nosná RNA úplne rozpustená v správnom objeme elučného pufru (AVE).

Vypočítajte objem zmesi lyzačného pufru (AL)/nosnej RNA potrebný na šaržu vzoriek výberom počtu vzoriek, ktoré sa majú súčasne spracovať, z tabuľky 1. Objemy sa vypočítajú pomocou tohto vzorového výpočtu:

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

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

kde: **n** = počet vzoriek, ktoré sa majú spracovať súčasne

**y** = vypočítaný objem lyzačného pufru (AL)

**z** = objem nosnej RNA/elučného pufru (AVE), ktorý sa má pridať do lyzačného pufru (AL)

Obrátením skúmavky 10-krát jemne zamiešajte obsah. Aby ste zabránili peneniu, nemiešajte vírivo.



**Tabuľka 1. Objemy lyzačného pufru (AL) a nosnej RNA/elučného pufru (AVE) potrebné pre postup QIAamp DSP Virus\***

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



Postup prípravy vzorky je optimalizovaný na 5,6 µg nosnej RNA na vzorku. Ak sa preukázalo, že pre váš amplifikačný systém je lepšie menšie množstvo nosnej RNA, preneste do skúmaviek obsahujúcich lyzačný pufer AL iba potrebné množstvo rozpustenej nosnej RNA. Pre každý mikrogram nosnej RNA požadovaný na prípravu pridajte 5 µl nosnej RNA rozpustenej v pufri Buffer AVE na mililiter lyzačného pufru (AL). Použitie menšieho množstva ako 5,6 µg nosnej RNA na vzorku sa musí validovať pre každý konkrétny typ vzorky a následný test.

\* Ak používate vnútornú kontrolu, primerane znížte objem lyzačného pufru (AL).

## Príprava premývacieho pufru 1 (AW1)\*

Pomocou odmerného valca pridajte 25 ml etanolu (96 – 100 %) do fľaše obsahujúcej 19 ml koncentráту premývacieho pufru 1 (AW1). Zaškrtnutím políčka na štítku označte, že bol pridaný etanol. Rekonštituovaný premývacie pufer 1 (AW1) skladujte pri izbovej teplote (15 – 25 °C).



Rekonštituovaný premývacie pufer 1 (AW1) vždy premiešajte tak, že fľašu pred začatím postupu niekoľkokrát prevrátite.

## Príprava premývacieho pufru 2 (AW2)†

Pomocou odmerného valca pridajte 30 ml etanolu (96 – 100 %) do fľaše obsahujúcej 13 ml koncentráту premývacieho pufru 2 (AW2). Zaškrtnutím políčka na štítku označte, že bol pridaný etanol. Rekonštituovaný premývacie pufer 2 (AW2) skladujte pri izbovej teplote (15 – 25 °C).



Rekonštituovaný premývacie pufer 2 (AW2) vždy premiešajte tak, že fľašu pred začatím postupu niekoľkokrát prevrátite.

## Príprava elučného pufru (AVE)

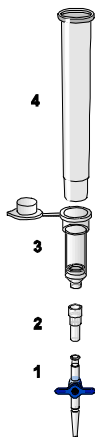
So súpravou sa dodávajú štyri skúmavky elučného pufru (AVE). Dajte pozor, aby ste nekontaminovali pufer RNázami. Ak vykonávate 4 alebo menej postupov purifikácie s použitím jednej súpravy, odporúčame skúmavku s elučným pufrom (AVE) zlikvidovať na konci každého postupu.

\* Obsahuje chaotropnú soľ. Prijmite príslušné laboratórne bezpečnostné opatrenia a pri manipulácii používajte rukavice. Nekompatibilné s dezinfekčnými prostriedkami obsahujúcimi bielidlo. Na strane 14 nájdete bezpečnostné informácie.

† Obsahuje azid sodný ako konzervačnú látku.

## Nastavenie vákuového systému QIAvac 24 Plus

Dbajte na správne nastavenie nastavca kolóny (EXT), kolóny QIAamp MinElute, VacConnector (VC) a VacValve (pozri obrázok 1).



**Obrázok 1. Montáž komponentov súpravy QIAamp DSP Virus Kit na vákuové spracovanie vzoriek:**

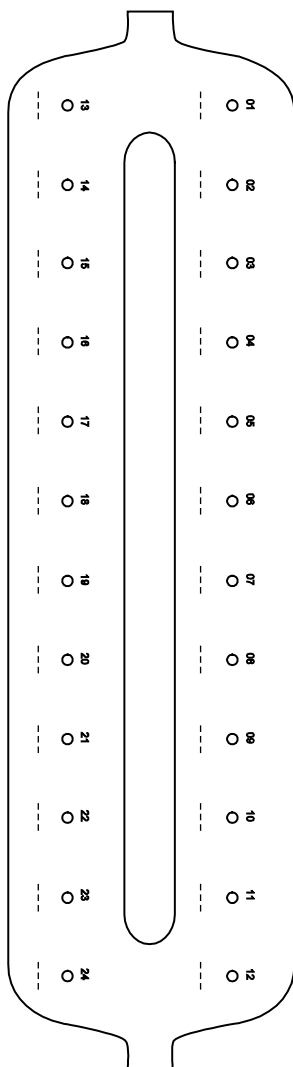
- |   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. VacValve (dodáva sa s vákuovým systémom) | 3. Kolóna QIAamp MinElute |
| 2. VacConnector (VC)                        | 4. Nadstavec kolóny (EXT) |

Odporúčame označiť lyzačné skúmavky (LT), elučné skúmavky (ET) a kolóny QIAamp MinElute na použitie vo vákuovom systéme QIAvac 24 Plus podľa schémy na obrázku 2, aby sa zabránilo zámene vzoriek. Tento obrázok môžete kopírovať a označiť názvami vzoriek.

Dátum: \_\_\_\_\_

Operátor: \_\_\_\_\_

ID spracovania: \_\_\_\_\_



**Obrázok 2. Schéma označovania pre lyzačné skúmavky (LT), elučné skúmavky (ET) a kolóny QIAamp MinElute na použitie vo vákuovom systéme QIAvac 24 Plus.**

# Protokol: Izolácia a purifikácia vírusových nukleových kyselín z plazmy a séra

Na izoláciu a purifikáciu vírusových nukleových kyselín z 500 µl plazmy a séra ošetreného EDTA alebo citrátom.

## Veci, ktoré je potrebné vykonať pred začatím

- Vykonajte ekvilibráciu vzoriek na izbovú teplotu (15 – 25 °C) a zabezpečte ich dobré premiešanie.
- Uistite sa, že všetky reagenty a kolóny QIAamp MinElute (v uzavretých blistroch) sú ekvilibrované na izbovú teplotu.
- Ohrievacie teleso nastavte na teplotu 56 °C na použitie v krokoch 4 a 17.
- Uistite sa, že premývací pufer 1 (AW1), premývací pufer 2 (AW2) a proteáza QIAGEN Protease (QP) boli pripravené podľa pokynov v časti Dôležité body pred začatím činnosti na strane 21.
- Ak sa v lyzačnom puffri (AL) vytvorila zrazenina, rozpustíte ju inkubáciou pri teplote 56 °C.
- Pridajte nosnú RNA rekonštituovanú v elučnom puffri (AVE) alebo internej kontrole do lyzačného puffra (AL) podľa pokynov na strane 23.
- Ak je to možné, na každý postup použite čerstvý elučný pufer (AVE) (k dispozícii sú 4 skúmavky).
- Aby ste minimalizovali krížovú kontamináciu, vložte do každého adaptéra Luer vákuového systému VacConnector (VC).
- Postupy kontroly kvality v spoločnosti QIAGEN využívajú funkčné testovanie uvoľnenia súpravy pre každú jednotlivú sériu súpravy. Preto nemiešajte reagenty z rôznych šarží súpravy a nekombinujte jednotlivé reagenty z rôznych šarží súpravy.
- Skontrolujte, či je fľaša na odpad vákuového systému prázdna a či sú všetky spojky správne pripojené.
- Podrobnosti o prevádzke vákuového systému, najmä o údržbe, nájdete v príručke dodanej s ním.

## Postup

1. Napipetujte 75 µl proteázy QIAGEN Protease (QP) do lyzačnej skúmavky (LT).



Pred použitím skontrolujte dátum expirácie rekonštituovanej proteázy.

2. Do lyzačnej skúmavky (LT) pridajte 500 µl plazmy alebo séra.

3. Do lyzačnej skúmavky (LT) pridajte 500 µl lyzačného pufru (AL) (ktorý obsahuje 11,2 µg/ml nosnej RNA), zatvorte viečko a miešajte pulzným vortexom  $\geq$  15 sekúnd.

Na zaistenie účinnej lýzy je nevyhnutné, aby vzorka a lyzačný pufer (AL) boli dôkladne zmiešané, aby vznikol homogénny roztok.



Lyzačný pufer (AL) obsahuje internú kontrolu. Keďže lyzačný pufer (AL) má vysokú viskozitu, nezabudnite opatrne pridať správny objem lyzačného pufru (AL) pipetou.



Nepridávajte proteázu QIAGEN Protease (QP) priamo do lyzačného pufru (AL).

4. Inkubujte pri teplote 56 °C po dobu 15 minút.

5. Odstredujte lyzačnú skúmavku (LT) po dobu  $\geq$ 5 sekúnd pri maximálnej rýchlosti na odstránenie kvapiek z vnútornej strany viečka.



6. Vymeňte si rukavice a opatrne otvorte lyzačnú skúmavku (LT).

7. Do lyzačnej skúmavky (LT) pridajte 600 µl etanolu (96 – 100 %), zatvorte viečko a dôkladne miešajte pulzným vortexom  $\geq$ 15 sekúnd. Inkubujte 5 minút pri izbovej teplote (15 – 25 °C).

8. Odstredujte lyzačnú skúmavku (LT) po dobu  $\geq$ 5 sekúnd pri maximálnej rýchlosti na odstránenie kvapiek z vnútornej strany viečka.

9. Vložte kolónu QIAamp MinElute do VacConnector (VC) na vákuovom systéme (pozri obrázok 1, strana 27). Vložte nadstavec kolóny (EXT) do otvorenej kolóny QIAamp MinElute.



Nechajte si premývaciu skúmavku (WT) na suché odstredovanie v kroku 16.



10. Vymeňte si rukavice a otvárajte vždy iba jednu skúmavku.

11. Celý lyzát z kroku 7 opatrne naneste do nadstavca kolóny (EXT) na kolóne QIAamp MinElute bez navlhčenia okraja.

12. Zapnite vákuové čerpadlo. Po pretiahnutí lyzátu cez kolónu QIAamp MinElute otvorte ventil vákuového systému a uvoľnite vákuum.

Ak spracovávate niekoľko kolón QIAamp MinElute súčasne, odporúčame uzavrieť VacValve každej kolóny po prechode lyzátu, aby sa skrátilo trvanie tohto kroku vákua.



Ak lyzát po 15 minútach úplne neprešiel membránou, zlikvidujte kolónu QIAamp MinElute a zopakujte postup s novou vzorkou.



Na rýchle uvoľnenie tlaku vákua by sa mal použiť ventil vákuového systému.

13. Aplikujte 600 µl premývacieho pufru 1 (AW1) do kolóny QIAamp MinElute. Opatrne odstráňte a zlikvidujte nadstavec kolóny (EXT) a zatvorte ventil vákuového systému. Po pretiahnutí premývacieho pufru 1 (AW1) cez kolónu QIAamp MinElute otvorte ventil a uvoľnite vákuum.



Aby ste predišli krížovej kontaminácii, zabezpečte, aby odstránené nadstavce kolóny (EXT) neprechádzali ponad susedné kolóny QIAamp MinElute.

14. Aplikujte 750 µl premývacieho pufru 2 (AW2) do kolóny QIAamp MinElute bez navlhčenia okraja. Viečko kolóny nechajte otvorené a zatvorte ventil vákuového systému. Po pretiahnutí premývacieho pufru 2 (AW2) cez kolónu QIAamp MinElute otvorte ventil a uvoľnite vákuum.

15. Aplikujte 750 µl etanolu (96 – 100 %) do kolóny QIAamp MinElute bez navlhčenia okraja. Viečko kolóny nechajte otvorené a zatvorte ventil vákuového systému. Po pretiahnutí etanolu cez kolónu QIAamp MinElute otvorte ventil a uvoľnite vákuum.



Pomocou pipetových hrotov s aerosólovou bariérou aplikujte etanol do kolóny QIAamp MinElute.

16. Zatvorte viečko kolóny QIAamp MinElute, vyberte ho z vákuového systému a zlikvidujte VacConnector (VC). Vložte kolónu QIAamp MinElute do premývacej skúmavky (WT) odloženej z kroku 9 a odstred'ujte pri maximálnej rýchlosti (približne 20 000 x g alebo 14 000 otáčok za minútu) po dobu 1 minúty, aby sa membrána úplne vysušila. Zlikvidujte premývaciu skúmavku (WT) obsahujúcu filtrát.



Vynechanie suchého odstred'ovania môže viesť k inhibícii následného testu.

17. Vložte kolónu QIAamp MinElute do novej premývacej skúmavky (WT) a inkubujte s otvoreným viečkom pri teplote 56 °C po dobu 3 minút, aby sa odparila zvyšná kvapalina.

18. Vložte kolónu QIAamp MinElute do čistej elučnej skúmavky (ET) a premývaciu skúmavku (WT) zlikvidujte. Opatrne otvorte viečko kolóny QIAamp MinElute a do stredu membrány aplikujte 20 µl alebo 60 µl elučného pufru (AVE) (v závislosti od následného testu).



Je dôležité použiť novú elučnú skúmavku, aby sa zabránilo kontaminácii zvyškov premývacích pufrů, ktoré by mohli viesť k inhibícii následného testu.



Dávkovanie elučného pufru na stred membrány je dôležité najmä pri menších elučných objemoch, aby sa zabezpečilo optimálne získavanie nukleových kyselín a elučného pufru.



Elučný objem je možné prispôbiť podľa požiadaviek následnej aplikácie. Nezabudnite, že objem získaného eluátu môže byť nižší ako objem elučného pufru aplikovaného na kolónu v dôsledku zvyšného elučného pufru zadržaného membránou centrifugačnej kolóny po centrifugácii.



Zaistite, aby bol elučný pufer ekvilibrovaný na izbovú teplotu.

19. Zatvorte viečko a inkubujte pri izbovej teplote (15 – 25 °C) po dobu ≥3 minút. Odstred'ujte pri maximálnej rýchlosti (približne 20 000 x g alebo 14 000 otáčok za minútu) po dobu 1 minúty, aby sa eluovali vírusové nukleové kyseliny.





Viečka elučných skúmaviek orientujte tak, aby smerovali proti smeru otáčania rotora (napr. ak sa rotor otáča v smere hodinových ručičiek, orientujte viečka proti smeru hodinových ručičiek).



Po vykonaní tohto protokolu postupujte podľa pokynov na údržbu vákuového systému (ďalšie podrobnosti nájdete v príručke dodávanej s vákuovým systémom).

## Kontrola kvality

V súlade s certifikovaným celkovým systémom riadenia kvality QIAGEN je každá šarža súpravy QIAamp DSP Virus Kit testovaná na základe vopred určených špecifikácií, aby bola zaistená konzistentná kvalita produktu.

## Obmedzenia

Výkonnosť systému bola stanovená v štúdiách hodnotenia výkonnosti pri čistení vírusových nukleových kyselín zo vzoriek ľudskej plazmy a séra.

Používateľ je zodpovedný za overenie výkonu systému pre všetky postupy používané v jeho laboratóriu, na ktoré sa nevzťahujú štúdie hodnotenia výkonnosti QIAGEN.

Aby sa minimalizovalo riziko negatívneho vplyvu na diagnostické výsledky, mali by sa použiť adekvátne kontroly pre následné aplikácie. Všetky získané diagnostické výsledky sa musia interpretovať v spojení s inými klinickými alebo laboratórnymi nálezmi.

## Charakteristiky účinnosti

Príslušné charakteristiky účinnosti nájdete v karte zdrojom na stránke výrobku na adrese [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Spríevodca riešením problémov

Tento spríevodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Viac informácií nájdete aj na stránke Často kladené otázky v našom stredisku technickej podpory: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Vedci v technických službách QIAGEN vám vždy radi zodpovedajú všetky otázky týkajúce sa informácií a/alebo protokolov v tejto príručke alebo technológií vzoriek a testov (kontaktné informácie nájdete na stránke [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentáre a návrhy

### Všeobecná manipulácia

- a) Upchávajúce špičky pipiet počas prenosu vzorky
- Zmrazené vzorky neboli po rozmrazení správne zmiešané. Rozmrazené vzorky mierne rozmiešajte, aby ste zaistili dôkladné premiešanie. Kryoprecipitáty vytvorené počas zmrazovania a rozmrazovania upchávajú membránu QIAamp MinElute. Ak zbadáte kryoprecipitáty, vyčistíte vzorku odstreďovaním počas 5 minút pri 16 000 x g.
- b) Upchatá kolóna QIAamp MinElute
- Ak sa zníži prietok, čas vákuovania sa môže predĺžiť.
- Prípadne zatvorte ventil VacValve, ak sa používa, a opatrne vyberte zostavu nadstavec kolóny-VacConnector-VacValve z kolóny QIAamp MinElute bez toho, aby ste stratili časť lyzátu v nadstavci kolóny.
- Vyberte kolónu QIAamp MinElute z vákuového potrubia, vložte ju do 2 ml premývacej skúmavky (WT) a otáčajte ju plnou rýchlosťou, kým vzorka úplne neprejde cez membránu. Vymeňte zostavu nadstavec kolóny-VacConnector-VacValve obsahujúcu zvyšný lyzát. Zapnite vákuové čerpadlo, otvorte VacValve a pokračujte vo vkladaní zvyšného lyzátu.
- Ak sa kolóna QIAamp MinElute naďalej upcháva, zopakujte uvedený postup.
- Kryoprecipitáty vytvorené počas zmrazovania a rozmrazovania upchávajú membránu kolóny QIAamp MinElute. Ak zbadáte kryoprecipitáty, vyčistíte vzorku odstreďovaním počas 5 minút pri 16 000 x g.

## Komentáre a návrhy

---

- Používanie ľadom chladeného etanolu počas lýzy môže pomôcť znížiť riziko upchatia membrány. Okrem toho je dôležité pridávať pufr na lýzu v správnom poradí opísanom vyššie. Nepridávajte proteázu QIAGEN Protease (QP) priamo do lyzačného pufru (AL).
- c) V lyzačnom puffri sa vytvoril precipitát      Rozpusťte inkubáciu lyzačného pufru (AL) pri teplote 56 °C.
- d) Rôzne elučné objemy      Objem regenerovaného eluátu závisí od povahy vzorky.
- Vzhľadom na zvyšný elučný pufer zadržaný membránou centrifugačnej kolóny po centrifugácii môže byť objem získaného eluátu nižší ako objem elučného pufru aplikovaného na kolónu.
- Do stredu membrány naneste elučný pufer. Dávkovanie elučného pufru na stred membrány je dôležité najmä pri menších elučných objemoch, aby sa zabezpečilo optimálne získavanie nukleových kyselín a elučného pufru.
- e) Vákuový tlak ~ 800 bar až ~ 900 mbar nebol dosiahnutý      Vákuové potrubie nie je tesne uzavreté. Po zapnutí vákua stlačte veko vákuového potrubia. Skontrolujte, či bol dosiahnutý vákuový tlak. Opotrebovalo sa tesnenie veka QIAvac. Vizualne skontrolujte tesnenie potrubia a v prípade potreby ho vymeňte.
- Ventily VacValves sa opotrebovali. Odstráňte všetky ventily VacValves a vložte VacConnectors priamo do nastavcov Luer. Vložte kolóny QIAamp MinElute do VacConnectors, zatvorte veko kolón a zapnite vákuum. Skontrolujte, či bol dosiahnutý vákuový tlak. V prípade potreby vymeňte ventily VacValves.
- Prípojenie k vákuovému čerpadlu je netesné. Uzavrte všetky nastavce Luer uzávermi Luer a zapnite vákuové čerpadlo. Skontrolujte, či je vákuový tlak po zapnutí čerpadla stabilný (a či je ventil Vacuum Regulator zatvorený). V prípade potreby vymeňte spojky medzi čerpadlom a vákuovým potrubím.
- Ak vákuový tlak nebol ešte dosiahnutý, vymeňte vákuové čerpadlo za silnejšie.

## Komentáre a návrhy

---

### DNA nefunguje správne v následných reakciách

- a) Neúplná lýza vzorky
- Ak bola proteáza QIAGEN Protease (QP) vystavená zvýšenej teplote dlhší čas, môže stratiť aktivitu. Zopakujte postup s použitím nových vzoriek a čerstvej proteázy QIAGEN Protease (QP).
- Uistite sa, že ste proteázu QIAGEN Protease (QP) rozpustili s rozpúšťadlom proteázy podľa vyššie uvedených pokynov. Aby ste zabránili peneniu, pri miešaní liekovku niekoľkokrát prevráťte. Skontrolujte, či je proteáza QIAGEN Protease (QP) úplne rozpustená. Nepridávajte proteázu QIAGEN Protease (QP) priamo do lyzačného pufru (AL).
- Na zaistenie účinnej lýzy je nevyhnutné, aby vzorka a lyzačný pufer (AL) boli dôkladne zmiešané, aby vznikol homogénny roztok. Keďže lyzačný pufer (AL) má vysokú viskozitu, nezabudnite opatrne pridať správny objem lyzačného pufru (AL) pipetou alebo pomocou vhodnej pipety.
- b) Bol použitý nízko-percentný etanol namiesto 96 – 100 % etanolu
- Postup purifikácie opakujte s novými vzorkami a s 96 – 100 % etanolom. Nepoužívajte denaturovaný alkohol, ktorý obsahuje ďalšie látky, ako je metanol alebo metylketón.
- c) Nesprávne pripravený premývací pufer 1 (AW1) alebo premývací pufer 2 (AW2)
- Pred začatím postupu sa uistite, že koncentráty premývacieho pufru 1 (AW1) a premývacieho pufru 2 (AW2) boli zriedené správnym objemom 96 – 100 % etanolu a premiešané niekoľkonásobným prevrátením fľaše.

## Komentáre a návrhy

---

- d) Vzorky plazmy a séra neboli správne pripravené, skladované alebo zmiešané
- Proces purifikácie je optimalizovaný pre použitie so vzorkami ľudskej plazmy a séra. Na prípravu plazmy sa môžu použiť vzorky krvi upravované EDTA alebo citrátom ako antikoagulantom. Po odbere a odstredení sa môže plazma alebo sérum skladovať pri teplote 2 – 8 °C až 6 hodín. Pri dlhodobom skladovaní sa odporúča zmrazenie na teplotu -80 °C až -20 °C v alikvótach.
- Zmrazené vzorky plazmy alebo séra sa nesmú rozmraziť viac než raz. Opakované zmrazovanie a rozmrazovanie vedie k denaturácii a zrážaniu bielkovín, čo má za následok redukciu vírusových titrov, a tým znížené výťažky vírusových nukleových kyselín.
- Rozmrazené zmrazené vzorky mierne rozmiešajte, aby ste zaistili dôkladné premiešanie.
- e) Málo DNA alebo žiadna DNA v eluáte
- Ak je to možné, znížte elučný objem alebo zvýšte množstvo eluátu pridaného do reakcie.
- f) Bol použitý nevhodný elučný objem
- Určite maximálny objem eluátu vhodný pre vašu následnú aplikáciu. Podľa toho znížte alebo zvýšte objem eluátu pridaného do následnej aplikácie. Objem elúcie sa môže priamo úmerne prispôsobiť. Elúcia s menšími objemami pufru Buffer AVE vedie k vyšším koncentráciám nukleových kyselín.
- g) Prenos potenciálneho inhibítora
- Pred elúciou nezabudnite vykonať krok suchej centrifugácie, aby ste zabránili potenciálnej inhibícii následného testu.
- Je dôležité použiť novú elučnú skúmavku, aby sa zabránilo kontaminácii zvyškov premývacích pufov, ktoré by mohli viesť k inhibícii následného testu.
- Podľa príkladných interferenčných štúdií pre súpravu QIAamp DSP Virus Kit a v súlade s normou ISO 20186-2:2019(E) môže heparín zo skúmaviek na odber krvi ovplyvniť čistotu izolovaných nukleových kyselín a prípadný prenos do eluátov môže v niektorých následných aplikáciách spôsobiť inhibície. Preto odporúčame používať vzorky krvi ošetrené EDTA alebo citrátom ako antikoagulantom.

## Komentáre a návrhy














---












- h) Degradovaná/nesprávne pripravená nosná RNA
- Nosná RNA slúži na dva účely: Po prvé, zvyšuje väzbu vírusových nukleových kyselín na membránu QIAamp, najmä ak je vo vzorke veľmi málo cieľových molekúl. Po druhé, pridanie veľkého množstva nosnej RNA znižuje riziko degradácie vírusovej RNA v zriedkavých prípadoch, keď molekuly RNázy uniknú z denaturácie chaotropnými soľami a detergentom v lyzačnom pufrí (AL).
- Ak sa nosná RNA nepridá do lyzačného pufru (AL), môže to viesť k zníženiu výťažku vírusovej RNA alebo DNA.
- Nosná RNA môže byť rozpustená iba v pufrí Buffer AVE; rozpustená nosná RNA sa musí okamžite pridať do lyzačného pufru (AL).
- Nosná RNA môže byť tiež zahrnutá v niektorých reagenciách internej kontroly komerčných následných testov. V týchto prípadoch si prečítajte príslušný návod na použitie od výrobcu následného testu.



# Symboly

V návode na použitie alebo na balení a štítkoch nájdete nasledujúce symboly:

Symbol	Definícia symbolu
 <N>	Obsahuje reagencie postačujúce na <N> reakcií
	Použite do
	Tento výrobok spĺňa požiadavky európskeho nariadenia 2017/746 o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro.
	Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro
	Katalógové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu (t. j. označenie komponentu)
	Komponenty
	Objem
	Obsahuje
	Číslo
	Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)
Rn	R označuje revíziu návodu na použitie a n je číslo revízie
	Teplotné obmedzenia

Symbol	Definícia symbolu
	Výrobca
	Prečítajte si návod na použitie
	Chráňte pred slnečným svetlom
	Varovanie/upozornenie
	Pri doručení
	Dôležitá poznámka
	Po kroku protokolu s touto značkou si vymeňte rukavice
	Pri doručení otvorte; kolónu QIAamp MinElute skladujte pri teplote 2 – 8 °C
	Po pridaní etanolu do fľaše si zapíšte aktuálny dátum
	Pridávanie
	Lyofilizovaný

**Symbol****Definícia symbolu**

---

<b>RCNS</b>	Pripraviť v
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>GuHCl</b>	Hydrochlorid guanidínu
<b>MALEIC ACID</b>	Kyselina maleinová
<b>SUBT</b>	Subtilizín
<b>➡</b>	Vedie k
<b>UDI</b>	Unikátny identifikátor pomôcky

# Príloha

## Manipulácia s RNA

Ribonukleázy (RNázy) sú veľmi stabilné a aktívne enzýmy, ktoré spravidla nevyžadujú fungovanie kofaktorov. Keďže je ťažké inaktivovať RNázy a na zničenie RNA postačujú iba malé množstvá, nepoužívajte žiadny plastový ani sklenený riad bez predchádzajúcej eliminácie nožnej kontaminácie RNázou. Je potrebné postupovať opatrne, aby sa zabránilo neúmyselnému zavedeniu RNáz do vzorky RNA počas procesu izolácie alebo po ňom. Aby sa vytvorilo a udržiavalo prostredie bez RNáz, musia sa počas predbežnej úpravy a používania jednorazových a viacnásobne použiteľných nádob a roztokov pri práci s RNA prijať nasledujúce preventívne opatrenia.

## Všeobecná manipulácia

Pri práci s RNA by sa mala vždy používať správna mikrobiologická aseptická technika. Rukami a prachovými časticami sa môžu prenášať baktérie a plesne a sú najbežnejším zdrojom kontaminácie RNázy. Pri manipulácii s reagensmi a vzorkami RNA vždy noste latexové alebo vinylové rukavice, aby ste zabránili kontaminácii RNázy z povrchu pokožky alebo z prachu laboratórneho vybavenia. Rukavice často vymieňajte a skúmavky udržiavajte uzavreté.

# Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.
QIAamp DSP Virus Kit (50)	Na 50 preparátov: Kolóny QIAamp MinElute, pufre, reagentie, skúmavky, nadstavce kolón a konektory VacConnectors	60704
<b>Príslušenstvo</b>		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold	Vákuové potrubie na spracovanie 1 – 24 centrifugačných kolón: Vákuové potrubie QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, zátky Luer, rýchlospojky	19413
Vacuum Pump	Univerzálne vákuové čerpadlo	84020
VacConnectors	500 jednorazových konektorov na použitie s centrifugačnými kolónami QIAamp na konektoroch Luer	19407
VacValves	24 ventilov na použitie s QIAvac 24 a QIAvac 24 Plus	19408
Vacuum Regulator	Vákuový regulátor Vacuum Regulator	19530
QIAvac Connecting System	Systém na pripojenie vákuového potrubia s vákuovým čerpadlom: obsahuje zásobník, odpadové fľaše, hadičky, spojky, ventil, manometer a 24 ventilov VacValves	19419

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v návode na použitie súpravy QIAGEN. Návod na použitie súpravy QIAGEN nájdete na lokalite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) alebo môžete oň požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

# História úprav dokumentu

<b>Revízia</b>	<b>Popis</b>
R1, jún 2022	<p>Verzia 2, revízia 1</p> <ul style="list-style-type: none"><li>● Aktualizácia súpravy na verziu 2 z dôvodu dodržania súladu s nariadením o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro</li><li>● Aktualizácia častí Zamýšľané použitie a Obmedzenia</li><li>● Aktualizácia časti Popis a princíp</li><li>● Aktualizácia častí Dodávané materiály (pridanie účinných látok) a Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú</li><li>● Aktualizácia časti Varovania a preventívne opatrenia</li><li>● Aktualizácia časti Skladovanie a manipulácia s reagenciami</li><li>● Aktualizácia časti Odber a skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi</li><li>● Aktualizácia častí Dôležité poznámky a Postup</li><li>● Aktualizácia časti Charakteristiky účinnosti</li><li>● Pridanie časti Príloha</li><li>● Pridanie časti Sprievodca riešením problémov</li><li>● Aktualizácia časti Symboly</li><li>● Aktualizácia časti Informácie o objednávaní</li></ul>

Táto strana je zámerne prázdna

Táto strana je zámerne prázdna



Táto strana je zámerne prázdna

### Obmedzená licenčná zmluva pre súpravu QIAamp® DSP Virus Kit

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa tohto produktu s nasledovnými podmienkami:

1. Produkt sa môže používať výlučne v súlade s protokolmi poskytovanými spolu s produktom a týmto návodom na použitie a môže sa používať výlučne s komponentmi obsiahnutými v paneli. Spoločnosť QIAGEN neudeluje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tohto panela s akýmkoľvek komponentmi, ktoré netvoria súčasť tohto panela s výnimkou ustanovení uvádzaných v protokoloch dodávaných spolu s produktom, tomto návode na použitie v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Niektoré z týchto protokolov boli poskytnuté používateľmi produktov od spoločnosti QIAGEN pre používateľov produktov od spoločnosti QIAGEN. Tieto protokoly neboli podrobne testované ani optimalizované spoločnosťou QIAGEN. Spoločnosť QIAGEN na ne neposkytuje žiadne záruky a neručí za to, že ich použitím nedôjde k porušeniu práv tretích strán.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že tento panel a/alebo jeho použitie neporuší práva tretích strán.
3. Tento panel a jeho komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tohto panela súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolí vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich s panelom a/alebo jeho komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na adrese [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group). Registrované názvy, ochranné známky atď. použité v tomto dokumente sa nesmú považovať za známky nechránené podľa zákona, i keď neboli ako také označené príslušným symbolom.

1127541SK 06/2022 HB-3032-001 © 2022 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

Objednávky [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Technická podpora [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) |  
Webová lokalita [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)