

Návod na použitie (Príručka) súpravy QIAamp[®] DSP Virus Spin Kit



Verzia 2



Na diagnostické použitie in vitro

Na použitie so súpravou QIAamp[®] DSP Virus Spin Kit



61704



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Nemecko



1127542SK

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	6
Elúcia vírusových nukleových kyselín	6
Výťažok a kvalita vírusových nukleových kyselín.....	7
Doplnenie interných kontrolných roztokov.....	8
Automatizovaná purifikácia vírusovej nukleovej kyseliny na prístroji QIAcube Connect MDx	8
Súhrn a vysvetlenie.....	11
Dodávané materiály	12
Obsah súpravy	12
Súčasti súpravy.....	13
Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú.....	14
Doplnkové reagensie	14
Spotrebný materiál	14
Zariadenie	14
Len pre automatizovaný postup	14
Varovania a preventívne opatrenia.....	16
Bezpečnostné informácie	16

Informácie pre prípad núdze	17
Preventívne opatrenia	18
Likvidácia	19
Skladovanie a manipulácia s reagensiami.....	20
Stabilita pri používaní	20
Odber, skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi	22
Dôležité poznámky	24
Dôležité body pred začatím činnosti.....	24
Manipulácia s kolónami QIAamp MinElute	25
Odstreďovanie.....	25
Spracovanie kolón QIAamp MinElute v mikrocentrífúge	25
Príprava reagensí a pufrov	26
Protokol: Purifikácia vírusových nukleových kyselín z plazmy alebo séra pomocou mikrocentrífúgy alebo prístroja QIAcube Connect MDx.....	31
Kontrola kvality	35
Obmedzenia	36
Charakteristiky účinnosti.....	37
Spríevodca riešením problémov	38
Symboly.....	42
Príloha	45
Informácie o objednávaní	46
História úprav dokumentu.....	48

Zamýšľané použitie

Súprava QIAamp® DSP Virus Spin Kit je určená na manuálnu, alebo v prípade použitia s prístrojom QIAcube® Connect MDx, na automatickú izoláciu a purifikáciu vírusových nukleových kyselín zo vzoriek ľudskej plazmy a séra.

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

Tento produkt je určený na in vitro diagnostické 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 Spin zahŕňa 4 kroky (lýza, viazanie, premytie a elúcia) a vykonáva sa pomocou kolón QIAamp MinElute® v štandardnej mikrocentrifúge alebo úplne automaticky na QIAcube Connect MDx. 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 Spin je vhodný na súčasné spracovanie viacerých vzoriek. Súpravu QIAamp DSP Virus Spin Kit je možné použiť na izoláciu vírusovej RNA a DNA zo širokej škály RNA a DNA vírusov. Avšak výkonnostné charakteristiky pre všetky druhy vírusov neboli stanovené a používateľ ich musí overiť.

Lýza s proteázou QIAGEN Protease (QP)

Vzorky sa lyzujú za vysoko 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 lyzáty cez ňu ťahá odstredovaním. 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.

2 ml premývací skúmavka (je súčasťou dodávky) dopĺňa kolónu QIAamp MinElute počas plnenia a premývania.

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 alučnom pufrí (AVE) ekvilibrovanom na izbovú teplotu. Kolóny QIAamp MinElute umožňujú minimálne elučné objemy iba 20 µl v manuálnom postupe a 60 µl v automatickom postupe. Nízky elučný objem vedie k vysoko koncentrovaným eluátom nukleovej kyseliny.

Pre následné aplikácie, ktoré vyžadujú malé počiatkové objemy (napr. niektoré testy PCR a RT-PCR), môže koncentrovanejší eluát zvýšiť citlivosť testu.

Pre následné aplikácie, ktoré vyžadujú väčší počiatkový objem, je možné zvýšiť elučný objem až na 150 µl v manuálnom postupe a do 100 µl v automatickom postupe. Zvýšenie elučného objemu však zníži koncentráciu nukleových kyselín v eluáte.

Z dôvodu zostávajúce elučného pufru, ktorý sa zachytí v odstredivej membráne kolóny po odstredovaní môže byť objem získaného eluátu nižší ako objem elučného pufru použitého v kolóne. Objem regenerovaného eluátu navyše závisí od povahy vzorky.

Eluovaná nukleová kyselina sa zachytí do elučných skúmaviek s objemom 1,5 µl (ET, sú súčasťou dodávky) a môže sa uskladniť pri teplote 2 – 8 °C až na 24 hodín. Pri dlhodobom skladovaní dlhšom ako 24 hodín, odporúčame skladovanie purifikovaných nukleových kyselín pri teplote -20 °C.

Poznámka: Stabilita eluátu veľmi závisí od rôznych faktorov a týka sa druhov vírusov a konkrétnej následnej aplikácie. Stanovila sa pre súpravu QIAamp DSP Virus Spin Kit pri použití so vzorovými následnými aplikáciami. Používateľ je zodpovedný za to, aby si prečítal

návod na použitie konkrétnej následnej aplikácie použitej vo svojom laboratóriu a/alebo validoval celý pracovný postup s cieľom stanoviť vhodné skladovacie podmienky.

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 Spin 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 preyšuje množstvo vírusových nukleových kyselín. Výpočty množstva eluátu, ktoré sa má pridať k následným amplifikáciám, by preto mali do úvahy množstve 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

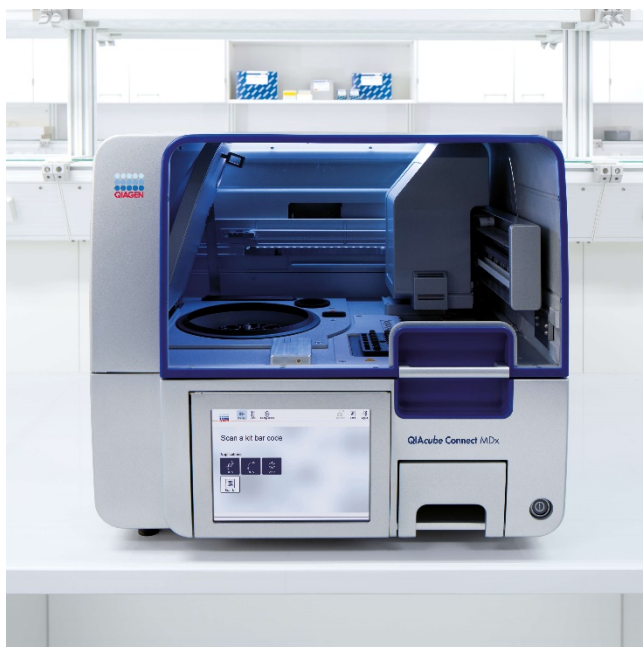
Používanie protokolu QIAamp DSP Virus Spin v kombinácii s komerčne dostupnými amplifikačnými systémami si môže vyžadovať zavedenie internej kontroly do purifikačného postupu. Interná kontrolná RNA alebo DNA by sa mala pridať do lyzačného pufru spolu s nosnou RNA. Pre optimálnu účinnosť čistenia by molekuly 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.

Automatizovaná purifikácia vírusovej nukleovej kyseliny na prístroji QIAcube Connect MDx

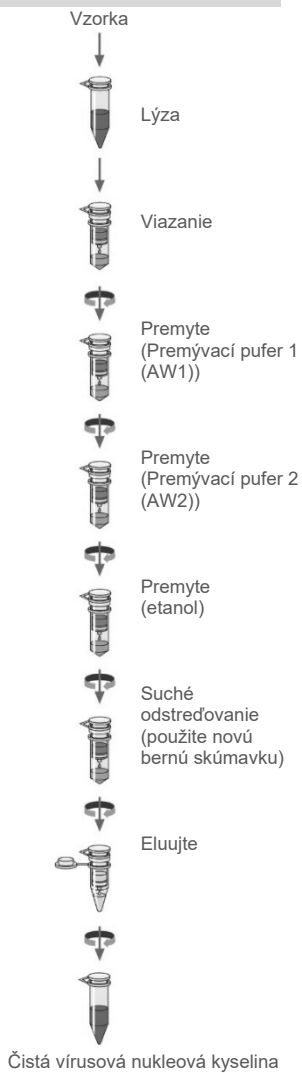
Prístroj QIAcube Connect MDx vykoná automatickú izoláciu a purifikáciu nukleových kyselín. Dokáže spracovať až 12 vzoriek v jednom cykle.

Ak automatizujete súpravu QIAamp DSP Virus Spin Kit na prístroji QIAcube Connect MDx, prístroj môže automatizovaným pipetovaním spracovať menej ako 50 vzoriek z dôvodu mŕtvych objemov, odparovania a ďalšej spotreby reagensie. V prípade manuálneho použitia súpravy QIAamp DSP Virus Spin Kit spoločnosť QIAGEN ručí iba za 50 pripravených vzoriek.



Obrázok 1. Prístroj QIAcube Connect MDx.

Postup pre QIAamp DSP Virus Spin



Automatizovateľné na prístroji QIAcube Connect MDx

Súhrn a vysvetlenie

Súprava QIAamp DSP Virus Spin Kit používa osvedčenú technológiu na súčasnú purifikáciu vírusovej DNA a RNA. Súprava kombinuje selektívne väzobné vlastnosti membrány na báze oxidu kremičitého s flexibilnými elučnými objemami od 20 do 150 µl v manuálnom pracovnom postupe.

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

Postup je možné použiť na izoláciu vírusovej RNA a DNA zo širokej škály RNA a DNA vírusov. Jednoduché postupy QIAamp DSP sú vhodné na súčasné spracovanie viacerých vzoriek. Tento postup je možné úplne automatizovať na prístroji QIAcube Connect MDx (strana 9) a dosiahnuť tak zvýšenú štandardizáciu a zjednodušenie použitia s elučnými objemami 60 – 100 µl v prírástkoch po 5 µl. Postup je navrhnutý tak, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii medzi vzorkami a aby sa umožnila bezpečná manipulácia s potenciálne infekčnými vzorkami. Vírusové nukleové kyseliny sa eluujú v elučnom pufrí (AVE), sú pripravené na použitie pri amplifikačných reakciách (PCR) alebo sa skladujú pri teplote -20 °C na neskoršie použitie.


Dodávané materiály

Obsah súpravy

QIAamp DSP Virus Spin Kit Katalógové č.

61704
50[§]

Počet príprav

QIAamp MinElute	QIAamp MinElute columns with Wash tube (kolóny QIAamp MinElute s premývacou skúmavkou) (WT) (2 ml)	COL	50
LT	Lysis Tubes (Lyzačné skúmavky) (2 ml)	LYS TUBE	50
ET	Elution Tubes (Elučné skúmavky) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
WT	Wash tube (Premývací skúmavka (WT)) (2 ml)	WASH TUBE	5 x 50
AL	Lysis Buffer (Lyzačný pufer)*	LYS BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1 (Premývací pufer 1) (AW1)* (koncentrát)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (Premývací pufer 2) (AW2)* (koncentrát)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE	Elution Buffer (Elučný pufer) [†] (purpurové viečka)	ELU BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent [‡] (Rozpúšťadlo proteázy)	QPROT SOLV	4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (Nosná RNA) (červené viečka)	CAR RNA	310 µg
QP	QIAGEN Protease (Proteináza QIAGEN) (QP) [‡]	QPROT	1 liekovka
–	Návod na použitie (Príručka)		1

* Obsahuje chaotropnú soľ. Pri manipulácii dodržiavajte vhodné bezpečnostné opatrenia a používajte rukavice. Nekompatibilné s dezinfekčnými prostriedkami obsahujúcimi bielidlo. Ďalšie informácie nájdete na strane 16.

[†] Obsahuje azid sodný ako konzervačnú látku.

[‡] Pozri „Príprava reagensí a pufov“, strana 26.

[§] Ak automatizujete súpravu QIAamp DSP Virus Spin Kit na prístroji QIAcube Connect MDx, prístroj môže automatizovaným pipetovaním spracovať menej ako 50 vzoriek z dôvodu mŕtvych objemov, odparovania a ďalšej spotreby reagensie. V prípade manuálneho použitia súpravy QIAamp DSP Virus Spin Kit spoločnosť QIAGEN ručí iba za 50 pripravených vzoriek.

Súčasti súpravy

Hlavné súčasti súpravy obsahujúce aktívne zložky sú uvedené nižšie.

Reagencia	Aktívne zložky	Koncentrácia (w/w) [%]
QIAGEN Protease (QP)	Subtilizín	≥ 90 až ≤ 100
AL	Hydrochlorid guanidínu Kyselina maleinová	≥ 30 až < 50 ≥ 0,1 až < 1
AW1	Hydrochlorid guanidínu	≥50 až < 70

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

Doplnkové reagenty

- 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
- Mikrocentrifúga† (s rotorom pre 1,5 ml a 2 ml skúmavky)
- Odmerný valec (50 ml)
- Vortex
- Pre vzorky s objemom < 200 µl: 0,9 % roztok NaCl

Len pre automatizovaný postup

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

*Nepoužívajte denaturovaný alkohol, ktorý obsahuje ďalšie látky, ako je metanol alebo metylketón.

† Pred použitím zabezpečte, aby sa prístroje skontrolovali a nakalibrovali podľa odporúčaní výrobcu.

- Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore (kat. č. 990452)
- Filter-Tips, 200 µl (kat. č. 990332)
- SafeSeal Tube, 1.5 ml, Sarstedt® (kat. č. 72.706)

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. Výrobci 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 on-line v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese www.qiagen.com/safety. Na tejto adrese môžete vyhľadať, zobraziť a vytlačiť kartu bezpečnostných údajov (KBÚ) pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.



UPOZORNENIE: NEPRIDÁVAJTE bieliace alebo kyslé roztoky priamo do odpadu z prípravy vzoriek.

- Lyzačný 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 pufre, 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 kvapalný odpad generovaný postupmi QIAamp DSP Virus Spin na zvyškové infekčné materiály. Kontaminácia kvapalného odpadu zvyškovými infekčnými materiálmi je vysoko nepravdepodobná, ale nemožno ju úplne vylúčiť. Preto musí byť tekutý odpad považovaný za infekčný a musí sa s ním zaobchádzať a likvidovať ho v súlade s miestnymi bezpečnostnými predpismi.
- Vzorky sú potenciálne infekčné. Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných postupov.

Informácie pre prípad núdze

CHEMTREC

USA a Kanada 1-800-424-9300

Mimo USA a Kanady +1703-527-3887

Preventívne opatrenia

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

Lysis Buffer (AL)



Obsah: 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 vytvoria 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)



Obsah: 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)



Obsah: 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 reagentie. 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, kde môžete vyhľadať, zobrazit' a vytlačiť SDS 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: Aby ste zaistili, že sa nezmiešajú súčasti rôznych súprav, označte kolóny QIAamp MinElute číslom šarže príslušnej súpravy.

Všetky pufré je možné skladovať pri izbovej teplote (15 – 25 °C) až do dátumu expirácie, ktorý je uvedený na obale 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 súpravy.

Stabilita pri používaní

Nosná RNA môže byť rozpustená iba v elučnom pufrí (AVE); pre manuálny postup, rozpustená nosná RNA sa musí okamžite pridať do lyzačného pufru (AL), ako je uvedené len na strane 27. Tento roztok sa musí pripraviť čerstvý a je stabilný pri teplote 2 – 8 °C až do 48 hodín. Nepoužitá časť nosnej RNA rozpustenej v elučnom pufrí (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 súpravy. 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. Na prípravu pufov pre automatický postup postupujte podľa pokynov v *používateľskej príručke QIAcube Connect MDx User Manual*.

Odber, skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi

Poznámka: Stabilita vzorky veľmi závisí od rôznych faktorov a týka sa druhov vírusov a konkrétnej následnej aplikácie. Vyhodnotila sa s použitím vzorových následných aplikácií. Používateľ je zodpovedný za to, aby si prečítal návod na použitie konkrétnej následnej aplikácie použitej vo svojom laboratóriu a/alebo validoval celý pracovný postup s cieľom stanoviť vhodné skladovacie podmienky.

Odporúčania pre všeobecný odber, prepravu a skladovanie si prečítajte odporúčanie CLSI MM13-A „Odber, skladovanie, preprava a skladovanie vzoriek pre molekulárne metódy“. Okrem toho je potrebné počas prípravy, skladovania, prepravy a všeobecnej manipulácie so vzorkou dodržiavať pokyny výrobcu pre vybrané zariadenie na odber vzorky.

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 antikoagulaciou. 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 -20 °C až -80 °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 virálnych titrov, a tým znížené výťažky vírusových nukleových kyselín. Kryoprecipitáty vytvorené počas zmrazovania a rozmrazovania navyše upchávajú membránu QIAamp MinElute. Ak sú kryoprecipitáty viditeľné, môžu sa granulovať odstredením pri približne 6800 × g počas 3 minút. Vyčistený supernatant by sa mal odstrániť a okamžite spracovať bez narušenia granule. Okamžite spustíte proces purifikácie. Odstredovanie pri nízkych silách g neznižuje virálne titre.

Poznámka: Podľa vzorových štúdií o interferenciách pre súpravu QIAamp DSP Virus Spin Kit a v súlade s normou ISO 20186-2:2019(E) môže mať heparín zo skúmaviek na odber krvi vplyv na čistotu izolovaných nukleových kyselín a prípadný prenos do eluátov môže spôsobiť inhibície v niektorých následných aplikáciách. Preto odporúčame používať vzorky krvi upravené pomocou EDTA alebo citrátu ako antikoagulantu.

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 16). 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. Ak dôjde ku kontaminácii rukavíc, zlikvidujte ich.
- Aby sa minimalizovalo riziko krížovej kontaminácie, otvárajte vždy iba jednu skúmavku.
- Po všetkých krokoch pulzného vortexovania mikrocentrifugačné skúmavky chvíľu odstred'ujte, aby sa odstránili kvapky z vnútornej strany viečka.
- Všetky kroky odstred'ovania sa uskutočňujú pri izbovej teplote (15 – 25 °C).
- Používateľ musí zaistiť uchovanie sledovateľnosti vzoriek počas celého procesu.
- So súpravami, ktoré práve používate, nepoužívajte komponenty súpravy z iných súprav, ak nie sú čísla šarží rovnaké.
- Zabráňte mikrobiálnej kontaminácii reagensí súpravy.
- Na minimalizovanie rizika infekcie potenciálne infekčným materiálom odporúčame pracovať v podmienkach laminárneho prúdenia vzduchu až do ukončenia lýzy vzoriek.
- V prípade automatického postupu postupujte podľa pokynov v používateľskom rozhraní (QIAcube Connect MDx) a prečítajte si príslušnú používateľskú príručku (k prístrojom QIAcube Connect MDx).
- 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 prenosmi každej 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.

Odstreďovanie

- Spolu so súpravou sa poskytujú premývacie skúmavky (WT) a elučné skúmavky pre všetky kroky odstredovania.
- Odstredenie kolón QIAamp MinElute sa vykonáva pri cca 6000 × g, aby sa znížilo rušenie pri odstredovaní. Odstredenie kolón QIAamp MinElute pri plnej rýchlosti neovplyvňuje výťažok DNA alebo RNA.
- Pri suchom odstredovaní na konci prania a pri elúcii by sa malo odstredenie vykonať pri plnej rýchlosti.
- Všetky kroky odstredovania by sa mali vykonávať pri izbovej teplote (15 – 25 °C).

Spracovanie kolón QIAamp MinElute v mikrocentrifúge

- Pred vložením do mikrocentrifúgy zatvorte kolónu QIAamp MinElute. Odstreďujte podľa popisu.
- Vyberte kolónu QIAamp MinElute a premyte skúmavku (WT) z mikrocentrifúgy.

- Vložte kolónu QIAamp MinElute do novej premývacej skúmavky (WT). Zlikvidujte filtrát a premývaciu skúmavku (WT). Pamätajte na to, že filtrát môže obsahovať nebezpečný odpad a mal by sa likvidovať príslušným spôsobom.
- Naraz otvárajte iba jedna kolóna QIAamp MinElute a dajte pozor, aby sa zabránilo tvorbe aerosólov.

Pre efektívne paralelné spracovanie viacerých vzoriek odporúčame naplniť stojan premývacími skúmavkami (WT), aby bolo možné kolóny QIAamp MinElute preniesť po odstredovaní. Použitú premývaciu skúmavku (WT) obsahujúcu filtrát je možné zlikvidovať a nové premývacie skúmavky (WT) obsahujúce kolóny QIAamp MinElute možno umiestniť priamo do mikrocentrifúgy.

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 45.

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.



Neprievádzajte 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 16 nájdete bezpečnostné informácie.

Pridanie nosnej RNA a internej kontroly do lyzačného pufru (AL)* (len pre manuálny postup)

Pri použití súpravy QIAamp DSP Virus Spin 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 sa použije interná kontrola, zmenší sa zodpovedajúco objem lyzačného pufru (AL) (pozri tabuľku 1 s ďalšími podrobnosťami).

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 Spin Kit používa počiatočný objem vzorky 200 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 pufróm (AL), sa uistite, že je nosná RNA úplne rozpustená v správnom objeme elučného pufru (AVE).

Pomocou tabuľky 1 na strane 29 vypočítajte objem zmesi lyzačného pufru (AL) a nosnej RNA potrebný na šaržu vzoriek výberom počtu vzoriek, ktoré sa majú súčasne spracovať. V prípade väčšieho počtu vzoriek možno objemy vypočítať pomocou vzorca pre vzorku, ktorý je uvedený nižšie:

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

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

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 (obj.) lyzačného pufru (AL) a zmesi nosnej RNA – elučnom pufru (AVE) požadované pre konkrétne počty (poč.) vzoriek pre postup QIAamp DSP Virus Spin*

Počet vzoriek	Obj. lyzačného pufru (AL)* (ml)	Obj. nosnej RNA-AVE (µl)	Počet vzoriek	Obj. lyzačného pufru (AL)* (ml)	Obj. nosnej RNA-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



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 elučnom pufri (AVE) na mililitr 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 sa použije interná kontrola, zmenší sa zodpovedajúco objem lyzačného pufru (AL).

Pri automatickom postupe pripravte nosnú RNA v AVE podľa popisu vyššie (aby ste získali roztok 1 µg/µl). V ďalšom kroku vložte do prístroja QIAcube Connect MDx dostatok roztoku nosnej RNA pre potrebný počet vzoriek plus dve ďalšie vzorky. Potrebné množstvo sa zobrazí v používateľskom rozhraní počas nakladania. Pridanie nosnej RNA do lyzačného pufru (AL) vykoná prístroj QIAcube Connect MDx.

Zmes internej kontroly sa pripraví podľa popisu na obrazovke prístroja QIAcube MDx. Interný kontrolný roztok sa pridá do zmesi nosnej RNA-AVE.

Príprava premývacieho pufru 1 (AW1)*

Pomocou odmerného valca pridajte 25 ml etanolu (96 – 100 %) do fľaše obsahujúcej 19 ml koncentrátu premývacieho pufru1(AW1) ako je uvedené na fľaši. Začiarknutím políčka na štítku označte, že bol pridaný etanol. Rekonštituovaný premývacie pufer 1 (AW1) skladujte pri izbovej teplote.



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 koncentrátu premývacieho pufru2(AW2) ako je uvedené na fľaši. Začiarknutím políčka na štítku označte, že bol pridaný etanol. Rekonštituovaný premývacie pufer 2 (AW2) skladujte pri izbovej teplote.



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 16 nájdete bezpečnostné informácie.

† Obsahuje azid sodný ako konzervačnú látku.

Protokol: Purifikácia vírusových nukleových kyselín z plazmy alebo séra pomocou mikrocentrifúgy alebo prístroja QIAcube Connect MDx

Na purifikáciu vírusových nukleových kyselín z 200 µl plazmy upravenej pomocou EDTA alebo citrátu alebo séra pomocou súpravy QIAamp DSP Virus Spin Kit a mikrocentrifúgy alebo automaticky na prístroji QIAcube Connect MDx.

Dôležité body pred začatím činnosti

- Postup popísaný nižšie obsahuje pokyny na spracovanie jednej vzorky. Je ale možné spracovať niekoľko vzoriek naraz, ich počet závisí od kapacity použitej mikrocentrifúgy.
- Automatické spracovanie 2 – 10 alebo 12 vzoriek je možní v prístroji QIAcube Connect MDx.
- V prípade automatického postupu postupujte podľa pokynov v používateľskom rozhraní (QIAcube Connect MDx) a prečítajte si používateľskú príručku k prístrojom QIAcube Connect MDx.

Postup, ktorý sa má 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 uzatvorených blistroch) sú ekvilibrované na izbovú teplotu.
- Nastavte ohrievacie teleso na 56 °C na použitie v kroku 4 (je potrebné pre manuálny postup a automatizovaný postup s externou manuálnou lýzou).

- Uistite sa, že premývací pufer 1 (AW1), premývací pufer 2 (AW2) a proteáza QIAGEN Protease (QP) boli pripravené podľa pokynov na stranách 26 – 30.
- Ak sa v lyzačnom pufrí (AL) vytvoril precipitát, rozpustíte ho inkubovaním pri teplote 56 °C.
- Pridajte nosnú RNA pripravenú v elučnom pufrí (AVE) do lyzačného pufru (AL) podľa pokynov na strane 27 (len v prípade manuálneho postupu).
- Ak je to možné, na každý postup použite čerstvý elučný pufer (AVE) (k dispozícii sú 4 skúmavky).
- Postupy kontroly kvality v spoločnosti QIAGEN využívajú testovanie uvoľnenia funkčnej súpravy pre každú jednu šaržu súpravy. Preto nemiešajte reagentie z rôznych šarží súpravy a nekombinujte jednotlivé reagentie z rôznych šarží reagentí.

Postup

- Pri manuálnom postupe s mikrocentrifúgou postupujte podľa krokov 1 – 15.
 - Tento postup môže byť automatický len na prístroji QIAcube Connect MDx v dvoch rôznych verziách:
 - Plasma or Serum_Standard (Plazma alebo Sérum štandard): Plná automatizácia s 200 µl vzorky (automatizácia začínajúca od kroku 1)
 - Plasma or Serum_Manual lysis (Lýza Plazma alebo Sérum manuálne): Čiastočne automatická s externou manuálnou lýzou s objemom 200 µl prvotnej vzorky (automatizácia začínajúca po kroku 5)
1. Napipetujte 25 µl proteázy QIAGEN Protease (QP) do lyzačnej skúmavky (LT).



Pred použitím skontrolujte dátum expirácie rekonštituovanej proteázy.

2. Do lyzačnej skúmavky (LT) pridajte 200 µl plazmy alebo séra.

Poznámka: Ak je objem vzorky menší ako 200 µl, pridajte vhodný objem 0,9 % roztoku chloridu sodného, aby sa objem proteázy a vzorky zvýšil na celkových 225 µl.

3. Pridajte 200 µl lyzačného pufru (AL) (obsahujúceho 28 µg/ml nosnej RNA a voliteľne internú kontrolu). Uzavrite viečko a miešajte pulzným vortexom počas ≥ 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 počas 15 minút v ohrievacom telese.

5. Krátko lyzačnú skúmavku (LT) odstredte, aby sa odstránili kvapky zvnútra viečka.

Poznámka: Ak sa manuálna lýza (kroky 1 – 15) uskutočnila externe, môžu byť tieto kroky (kroky 6– 15) automatické: „Protokol manuálnej lýzy“ na prístroji QIAcube Connect MDx.

6. Do vzorky pridajte 250 µl etanolu (96 – 100 %), zatvorte veko a dôkladne zamiešajte pomocou pulzného vortexovania na ≥ 15 sekúnd. Lyzát inkubujte etanolom na 5 minút pri izbovej teplote (15 – 25 °C).

7. Krátko skúmavku odstredte, aby sa odstránili kvapky zvnútra viečka.

8. Opatrne naneste všetok lyzát z kroku 7 na kolónu QIAamp MinElute bez navlhčenia okraja. Uzavrite viečko a odstredujte pri cca 6000 $\times g$ na > 1 min. Kolónu QIAamp MinElute umiestnite do čistej 2 ml premývacej skúmavky (WT) a premývaciú skúmavku (WT) obsahujúcu filtrát zlikvidujte.



Ak lyzát po odstredovaní neprešiel úplne do kolóny, znova odstredujte pri vyššej rýchlosti, kým nie je kolóna QIAamp MinElute prázdna.

9. Opatrne otvorte kolónu QIAamp MinElute a pridajte 500 µl premývacieho pufru 1 (AW1) bez navlhčenia okraja. Uzavrite viečko a odstredujte pri cca 6000 $\times g$ na ≥ 1 min. Kolónu QIAamp MinElute umiestnite do čistej 2 ml premývacej skúmavky (WT) a premývaciú skúmavku (WT) obsahujúcu filtrát zlikvidujte.

10. Opatrne otvorte kolónu QIAamp MinElute a pridajte 500 µl premývacieho pufru 2 (AW2) bez navlhčenia okraja. Uzavrite viečko a odstredujte pri cca 6000 × g na > 1 min. Kolónu QIAamp MinElute umiestnite do čistej 2 ml premývacej skúmavky (WT) a premývaciú skúmavku (WT) obsahujúcu filtrát zlikvidujte.

11. Opatrne otvorte kolónu QIAamp MinElute a pridajte 500 µl etanolu (96 – 100 %) bez navlhčenia okraja. Uzavrite viečko a odstredujte pri cca 6000 × g na > 1 min. Zlikvidujte premývaciú skúmavku (WT) obsahujúcu filtrát.



Prenos etanolu do eluátu môže spôsobiť problémy v následných aplikáciách. Niektoré rotory odstredivky môžu pri spomalení vibrovať, čo má za následok prietok, ktorý obsahuje etanol, ktorý sa dostane do kontaktu s kolónou QIAamp MinElute. Odstránenie kolóny QIAamp MinElute a premývacej skúmavky (WT) z rotora môže tiež spôsobiť kontakt prietoku s kolónou QIAamp MinElute.

12. Kolóna QIAamp MinElute umiestnite do čistej 2 ml premývacej skúmavky (WT). Odstredujte pri plnej rýchlosti (cca 20 000 × g) počas 3 minút, aby sa membrána úplne vysušila.



Vynechanie suchého odstredovania môže viesť k inhibícii následného testu.

13. Umiestnite stípec QIAamp MinElute do novej 2 ml premývacej skúmavky (WT), otvorte veko a inkubujte zostavu pri teplote 56 °C počas 3 minút, aby sa membrána úplne vysušila a aby sa zvyšná tekutina úplne vyparila.


14. Kolónu QIAamp MinElute umiestnite do novej elučnej skúmavky (ET) a zlikvidujte premývaciú skúmavku (WT) s filtrátom. Opatrne otvorte viečko kolóny QIAamp MinElute a do stredu membrány aplikujte 20 –150 µl elučného pufru (AVE).




Je dôležité použiť novú elučnú skúmavku, aby sa predišlo kontaminácii zvyškovými premývacími puframi, ktorá môže viesť k inhibícii následného testu.




Rozptýlenie elučného pufru do stredu membrány je dôležité najmä pre menšie elučné objemy, aby sa zaistilo optimálne získanie nukleových kyselín a elučného pufru.

 Elučný objem je možné ho prispôbiť podľa požiadaviek následnej aplikácie. V automatickom pracovnom postupe sú možné elučné objemy 60 – 100 µl v prírastkoch po 5 µl. Nezabudnite, že získaný elučný objem môže byť nižší ako objem elučného pufru vloženého do kolóny z toho, dôvodu, že elučný pufer zachytí membrána odstreďovacej kolóny po odstredení.

 Zaistite, aby bol elučný pufer ekvilibrovaný na izbovú teplotu.

15. Zatvorte viečko a inkubujte pri izbovej teplote počas ≥ 3 minút. Odstreďujte pri plnej rýchlosti (cca $20\,000 \times g$) na 1 min.

 Uzávery elučných skúmaviek umiestnite tak, aby smerovali proti rotácii rotora (napr. ak sa rotor otáča v smere hodinových ručičiek, nasmerujte uzávery proti smeru hodinových ručičiek).

 V prípade všetkých automatických procesov vyberte z prístroja hneď po dokončení cyklu eluáty a správne ich uskladnite.

Kontrola kvality

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

Obmedzenia

Účinnosť systému bol stanovený v štúdiách účinnosti výkonu pre purifikáciu 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 výkonnosti QIAGEN.

Aby sa minimalizovalo riziko negatívneho vplyvu na diagnostické výsledok, 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

Charakteristiky účinnosti nájdete v karte zdrojov na stránke výrobku na adrese 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. 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).

Komentáre a návrhy

Všeobecná manipulácia

- a) Upchatie pipetovacích hrotov 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 upchajú membránu QIAamp MinElute. Ak sú kryoprecipitáty viditeľné, vyčistite vzorku odstredením na 5 minút pri otáčkach 16 000 × g.
- b) Upchatá kolóna QIAamp MinElute
- Ak lyzát úplne neprešiel cez membránu po odstredení pri 6 000 × g otáčkach (8000 ot./min.), vykonajte ďalšie odstredenie pri plnej rýchlosti (do 20 800 × g) na 1 minútu.
- Ak lyzát stále neprejde cez membránu počas odstredovania, vzorku zlikvidujte a zopakujte izolovanie a purifikáciu s materiálom novej vzorky, pričom začnite na kroku 1.
- Kryoprecipitáty vytvorené počas zmrazovania a rozmrazovania upchajú stĺpec membránu kolóny QIAamp MinElute. Ak sú kryoprecipitáty viditeľné, vyčistite vzorku odstredením na 5 minút pri otáčkach 16 000 × g.
- Použitie ľadom chladeného etanolu počas lýzy môže pomôcť znížiť riziko upchatia membrány. Okrem toho je nevyhnutné pridať pufru do lýzy v správnom poradí popísanom vyššie. Nepridávajte proteázu QIAGEN Protease (QP) priamo do lyzačného pufru (AL).

Komentáre a návrhy

- c) V lyzačnom pufrí sa vytvoril precipitát
Rozpusťte ho inkubáciou lyzačného pufru (AL) pri teplote 56 °C.
- d) Variabilné elučné objemy
Objem regenerovaného eluátu závisí od povahy vzorky.
Z dôvodu zostávajúce elučného pufru, ktorý sa zachytí v odstredivej membráne kolóny po odstredovaní môže byť objem získaného eluátu nižší ako objem elučného pufru použitého v kolóne.
Do stredu membrány naneste elučný pufer. Rozptýlenie elučného pufru do stredu membrány je dôležité najmä pre menšie elučné objemy, aby sa zaistilo optimálne získanie nukleových kyselín a elučného pufru.
- e) Pri problémoch s automatickým pracovným postupom
Pozri *používateľskú príručku prístroja QIAcube Connect MDx*.

DNA nefunguje dobre v následných aplikáciách

- a) Neúplná lýza vzorky
Ak bola proteínáza QIAGEN Proteinase (QP) vystavená zvýšenej teplote dlhší čas, môže stratiť aktivitu. Zopakujte postup s novými vzorkami a čerstvou proteínázou QIAGEN Protease (QP).
Nezabudnite rozpustiť proteínázu QIAGEN Protease (QP) pomocou rozpúšťadla proteázy podľa pokynov vyššie. Aby ste zabránili peneniu, pri miešaní liekovku niekoľkokrát prevráťte. Skontrolujte, či je proteáza QIAGEN Protease (QP) úplne rozpustená. Neprikladajte 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 a použite vhodnú pipetu.
- b) Nízko-percentný etanol použitý namiesto etanolu 96 – 100 %
Postup purifikácie opakujte s novými vzorkami a 96 – 100 % etanolom. Nepoužívajte denaturovaný alkohol, ktorý obsahuje ďalšie látky, ako je metanol alebo metylketón.














Komentáre a návrhy

- c) Nesprávne pripravený premývací pufer 1 (AW1) alebo premývací pufer 2 (AW2)
- Uistite sa, že koncentrácie premývacieho pufru 1 (AW1) a premývacieho pufru 2 (AW2) sa zriedili so správnym objemom 96 – 100 % etanolu a zmiešali niekoľkonásobným otočením fľaštičky pred začatím postupu.
- d) Vzorky plazmy a séra sa pripravili, uskladnili alebo zmiešali nesprávne
- 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 antikoaguláciou. 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 -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 virálnych titrov, a tým znížené výťažky vírusových nukleových kyselín.
- Rozmrazené zmrazené vzorky mierne rozmiešajte, aby ste zaistili dôkladné premiešanie.
- e) Málo alebo žiadna DNA v eluáte
- Znížte elučný objem alebo zvýšte množstvo eluátu pridaného do reakcie, ak je to možné.
- f) Použitý nevhodný elučný objem
- Stanovte maximálny objem eluátu, ktorý je vhodný pre následnú aplikáciu. Príslušne znížte alebo zvýšte objem eluátu pridaného do následnej aplikácie. Elučný objem je možné pomerne prispôsobiť. Elúcia s menšími objemami elučného pufru (AVE) vedie k vyšším koncentráciám nukleových kyselín.

- g) Prenos potenciálneho inhibítora
- Určite vykonajte suché odstredenie pred elúciou, aby ste predišli potenciálnej inhibícii následného testu.
- Je dôležité použiť novú elučnú skúmavku, aby sa predišlo kontaminácii zvyškovými premývacími puframi, ktorá môže viesť k inhibícii následného testu. Podľa vzorových štúdií o interferenciách pre súpravu QIAamp DSP Virus Spin Kit a v súlade s normou ISO 20186-2:2019(E) môže mať heparín zo skúmaviek na odber krvi vplyv na čistotu izolovaných nukleových kyselín a prípadný prenos do eluátov môže spôsobiť inhibície v niektorých následných aplikáciách. Preto odporúčame používať vzorky krvi upravené pomocou EDTA alebo citrátu ako antikoagulantu.
- 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, prídanie 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 elučnom pufrí (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.

Symbols

Nasledujúce symboly sú uvedené v návode na použitie alebo na balení a štítkoch:

Symbol	Definícia symbolu
 <N>	Obsahuje reagencie postačujúce na <N> reakcií
	Prečítajte si návod na použitie
	Použite do
	Tento výrobok spĺňa požiadavky európskeho nariadenia 2017/746 pre pomôcky na použitie v podmienkach in vitro.
	Zdravotnícke diagnostické pomôcky na použitie v podmienkach in vitro
	Katalógové číslo
	Dôležitá poznámka
	Číslo šarže
	Číslo materiálu (t. j. označenie komponentu)
	Komponenty
	Objem
	Teplotné obmedzenia
	Výrobca

Symbol

Definícia symbolu



Pri doručení



Pri doručení otvorte; kolónu QIAamp MinElute skladujte pri teplote 2 – 8 °C



Po pridaní etanolu do fľaše si zapíšte aktuálny dátum

ADD

Pridávanie

CONT

Obsahuje

LYOPH

Lyofilizovaný

RCNS

Pripraviť v

EtOH

Etanol

GuHCl

Hydrochlorid guanidínu

MALEIC ACID

Kyselina maleinová

SUBT

Subtilizín

GTIN

Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)



Vedie k

NUM

Číslo

Rn

R označuje revíziu návodu na použitie a n je číslo revízie



Chráňte pred slnečným svetlom

Symbol

Definícia symbolu



Varovanie/upozornenie



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 udržovalo 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 prachového laboratórneho vybavenia. Rukavice často vymieňajte a skúmavky udržiavajte uzavreté.

Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.
QIAamp DSP Virus Spin Kit (50)	Na 50 preparátov: Kolóny QIAamp MinElute, pufre, reagentie, skúmavky, VacConnectors	61704
Súvisiace produkty		
QIAcube Connect MDx*	Prístroj a 1-ročná záruka na diely a prácu	9003070
Príslušenstvo		
Rotor Adapters	Na 240 preparátov: 240 jednorazových adaptérov rotora a 240 elučných skúmaviek (1,5 ml); na použitie s prístrojom QIAcube Connect MDx	990394
Rotor Adapter Holder	Držiak na 12 jednorazových adaptérov rotora, na použitie s prístrojom QIAcube Connect MDx	990392
Sample Tubes CB	1000 kónických skúmaviek so skrutkovacím uzáverom bez lemovanej spodnej časti (2 ml) na použitie s prístrojom QIAcube Connect MDx	990382
Shaker Rack Plugs	Na naloženie stojana trepačky QIAcube Connect MDx	9017854
Reagent Bottles, 30 ml	Fľašky na reagentie (30 ml) s uzávermi, balenie po 6, na použitie s prístrojom QIAcube Connect MDx	990393

Filter-Tips, 1000 µl	Jednorazové filtračné špičky, v stojane; (8 x 128). Na použitie s prístrojom QIAcube Connect MDx	990352
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore	Jednorazové filtračné špičky, so širokým otvorom, v stojane, (8 x 128), nie sú potrebné pre všetky protokoly. Na použitie s prístrojom QIAcube Connect MDx	990452
Filter-Tips, 200 µl	Jednorazové filtračné špičky, v stojane; (8 x 128). Na použitie s prístrojmi QIAcube Connect MDx a QIASymphony SP/AS	990332

* Prístroj QIAcube Connect MDx nie je dostupný vo všetkých krajinách. Ďalšie podrobnosti vám poskytne technický servis spoločnosti QIAGEN.

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v príslušnom návode na použitie k súprave QIAGEN. Návody na použitie k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite www.qiagen.com alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

História úprav dokumentu

Revízia

Popis

R1, jún 2022

Verzia 2, revízia 1

- Aktualizácia na verziu súpravy 2 na dodržanie IVDR
- Aktualizácia častí Zamýšľané použitie a obmedzenia
- Aktualizácia časti Popis a princíp
- Aktualizácia časti Dodávané materiály (pridanie aktívnych zložiek) a požadované materiály, ktoré sa nedodávajú
- Aktualizácia časti Varovania a preventívne opatrenia (pridanie informácií pre prípad núdze a likvidácie)
- Aktualizácia časti Skladovanie a manipulácia s reagensiami
- Aktualizácia časti Odber, skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi
- Aktualizácia časti Dôležité poznámky a postup
- Aktualizácia časti Charakteristiky účinnosti
- Aktualizácia časti Príloha
- Pridanie sprievodu riešením problémov
- Aktualizácia časti Symboly
- Aktualizácia informácií o objednávaní

Táto strana je zámerne prázdna

Táto strana je zámerne prázdna

Obmedzená licenčná zmluva pre súpravu QIAamp® DSP Virus Spin 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 neudeľuje 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. Niektoré z týchto protokolov boli poskytnuté používateľmi produktov od spoločnosti QIAGEN pre používateľov produktov od spoločnosti QIAGEN. Tieto protokoly neboli podrobné 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.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAcube®, 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.

1127542SK 06/2022 HB-3031-001 © 2022 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

Objednávky www.qiagen.com/shop | Technická podpora support.qiagen.com |
Webová lokalita www.qiagen.com