

Sierpień 2018

QIAamp[®] DSP Virus Kit

— Instrukcja obsługi



Zestaw QIAamp DSP Virus Kit jest systemem generycznym, wykorzystującym technologię QIAamp do izolacji i oczyszczania wirusowych kwasów nukleinowych z próbek ludzkiego osocza lub surowicy do procedur diagnostycznych in vitro.

Do diagnostyki in vitro

IVD

CE

REF

60704

i

1114514PL

QIAGEN logo

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R3 MAT

1114514PL

Spis treści

Spis treści	2
Zawartość zestawu	3
Symbole	4
Przechowywanie	6
Kontrola jakości	6
Przeznaczenie	7
Ograniczenia zastosowania produktu	7
Uwagi i środki ostrożności	8
Wstęp	11
Zasada i procedura	11
Parametry skuteczności	12
Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika	17
Ważne informacje	18
Ważne informacje przed rozpoczęciem	18
Przygotowanie RNA	19
Przechowywanie próbek	19
Przygotowanie odczynników i buforów	20
Elucja wirusowych kwasów nukleinowych	23
Uzysk i jakość wirusowych kwasów nukleinowych	24
Ustawianie systemu próżniowego QIAvac 24 Plus	25
Protokół: Izolacja i oczyszczanie wirusowych kwasów nukleinowych z osocza i surowicy	28
Historia zmian	32

Zawartość zestawu

QIAamp DSP Virus Kit						
Nr katalogowy				60704		
Liczba przygotowań				50		
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (WT) (Kolumny QIAamp MinElute z probówkami do płukania (WT)) (2 ml)	COL		50		
EXT	Column Extenders (Przedłużacze kolumn) (3 ml)	COL	EXT	50		
ET	Elution Tubes (Probówki do elucji) (1,5 ml)	ELU	TUBE	50		
VC	VacConnectors (Złącza VacConnector)	VAC	CON	50		
LT	Lysis Tubes (Probówki do lizy) (2 ml)	LYS	TUBE	50		
WT	Wash Tubes (Probówki do płukania) (2 ml)	WASH	TUBE	50		
AL	Lysis Buffer* (Bufor do lizy)	LYS	BUF	33 ml		
AW1	Wash Buffer 1* (Bufor do płukania 1) (koncentrat)	WASH	BUF	1	CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Bufor do płukania 2) (koncentrat)	WASH	BUF	2	CON	13 ml
AVE	Elution Buffer‡ (Bufor do elucji) (fioletowe zatyczki)	ELU	BUF			4 x 2 ml
PS	Protease Solvent† (Rozpuszczalnik proteazy)	QPROT	SOLV			4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (Nośnik RNA) (czerwone zatyczki)	CAR	RNA			310
QP	QIAGEN® Protease (Proteaza firmy QIAGEN)	QPROT				1 fiolka

* Zawiera chlorowoderek guanidyny. Produkt nie jest zgodny ze środkami dezynfekującymi zawierającymi wybielacz. Informacje dotyczące bezpieczeństwa znajdują się na stronie 8.

† Zawiera azydki sodu jako środek konserwujący.

‡ Objętość ponownego zawieszenia 4,4 ml.

Symbole



Zestaw zawiera odczynniki do przygotowania 50 próbek



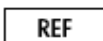
Należy zapoznać się z informacjami podanymi w instrukcji obsługi



Należy zużyć przed



Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro



Numer katalogowy



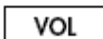
Numer serii



Numer materiału



Składniki



Objętość



Zakres temperatury



Po otrzymaniu



Oficjalny producent



Ważna informacja



Po wykonaniu etapu protokołu oznakowanego tym znakiem należy zmienić rękawiczki



Otworzyć w momencie dostawy; kolumny QIAamp Mini Spin przechowywać w temperaturze 2–8°C



Globalny numer jednostki handlowej



Po dodaniu etanolu do butelki zapisać bieżącą datę



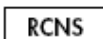
Dodawanie



Zawiera



Liofilizowane



Rekonstruować w

EtOH

Etanol

GuHCl

Chlorowodorek guanidyny

MALEIC ACID

Kwas maleinowy

SUBT

Subtylizyna



Prowadzi do

Przechowywanie

Kolumny QIAamp MinElute należy po otrzymaniu przechowywać w temperaturze 2–8°C.

Wszystkie bufor można przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C).

Liofilizowany nośnik RNA można przechowywać w temperaturze pokojowej do upływu terminu ważności. Nośnik RNA można rozpuszczać wyłącznie w buforze do elucji (AVE); rozpuszczony nośnik RNA należy natychmiast dodać do buforu do lizy (AL) zgodnie z opisem na stronie 20. Ten roztwór należy świeżo przygotowywać i jest on stabilny w temperaturze 2–8°C przez maks. 48 godzin. Niewykorzystaną część nośnika RNA rozpuszczonego w buforze do elucji (AVE) należy zamrozić w równych porcjach w temperaturze –20°C.

Liofilizowaną proteazę firmy QIAGEN (QP) można przechowywać w temperaturze pokojowej do upływu terminu ważności bez negatywnego wpływu na działanie.

Zrekonstruowana proteaza firmy QIAGEN (QP) jest stabilna przez maks. 1 rok w przypadku przechowywania w temperaturze 2–8°C, ale tylko do upływu terminu ważności.

Zrekonstruowany bufor do płukania 1 (AW1) i zrekonstruowany bufor do płukania 2 (AW2) są stabilne przez maks. 1 rok w przypadku przechowywania w temperaturze pokojowej, ale tylko do upływu terminu ważności.

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem całkowitym systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu QIAamp DSP Virus Kit jest testowana ze wstępnie ustalonymi specyfikacjami w celu zapewnienia spójnej jakości produktu.

Przeznaczenie

Zestaw QIAamp DSP Virus Kit jest systemem generycznym, wykorzystującym technologię QIAamp do izolacji i oczyszczania wirusowych kwasów nukleinowych z próbek ludzkiego osocza lub surowicy do celów diagnostycznych in vitro. Wszelkie wyniki diagnostyczne uzyskane z wykorzystaniem procedury przygotowania próbki w połączeniu z dowolnym dalszym oznaczeniem diagnostycznym NAT należy interpretować, biorąc pod uwagę wyniki badań klinicznych lub laboratoryjnych.

Produkt jest przeznaczony do stosowania przez profesjonalnych użytkowników, takich jak technicy i lekarze przeszkoleni w zakresie technik biologii molekularnej. Jest on przeznaczony dla dowolnych dalszych zastosowań wykorzystujących amplifikację enzymatyczną lub inne enzymatyczne modyfikacje DNA lub RNA, a następnie detekcję sygnału lub amplifikację. Wyizolowane i oczyszczone wirusowe kwasy nukleinowe można stosować w jakościowych (np. przesiewowe badanie krwi), jak również ilościowych (np. monitorowanie wiremii) oznaczeniach diagnostycznych NAT.

W celu zminimalizowania nieprawidłowości wyników diagnostycznych produkt jest przeznaczony do stosowania z kontrolą wewnętrzną oraz kontrolą pozytywną i negatywną podczas procesu przygotowania próbki, amplifikacji i detekcji zgodnie ze stosowanym następnie oznaczeniem.

Produkt jest przeznaczony do stosowania z systemem próżniowym QIAvac 24 Plus lub równoważnym systemem próżniowym.

Ograniczenia zastosowania produktu

Zestaw nie jest przeznaczony do stosowania z próbkami krwi, tkanek, szpiku kostnego lub hodowli komórkowych. Zestaw nie jest również przeznaczony do izolacji ani oczyszczania kwasów nukleinowych bakterii, grzybów lub pasożytów. Nie oceniono działania zestawu w przypadku izolacji i oczyszczania wirusowych kwasów nukleinowych z innych bezkomórkowych płynów ustrojowych, takich jak moczu i płynu mózgowo-rdzeniowego.

Uwagi i środki ostrożności

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (safety data sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

OSTRZEŻENIE: Nie dodawać wybielacza ani roztworów kwasowych do odpadów pozostałych po przygotowaniu próbek.

Bufor do lizy (AL) i bufor do płukania 1 (AW1) zawierają chlorowodorek guanidyny, który może tworzyć wysoce reaktywne związki w połączeniu z wybielaczem. W przypadku rozlania płynu zawierającego te bufony należy wyczyścić go za pomocą odpowiedniego detergentu laboratoryjnego i wody. Jeśli rozlany płyn zawiera czynniki potencjalnie zakaźne, należy wyczyścić zalany obszar najpierw detergentem laboratoryjnym i wodą, a następnie 1-procentowym (stężenie objętościowe) podchlorynem sodu.

Jeśli butelki zawierające bufor są uszkodzone lub nieszczelne, podczas ich wyrzucania należy nosić rękawiczki i okulary ochronne, aby uniknąć obrażeń ciała lub spowodowania obrażeń u innych osób.

Firma QIAGEN nie badała odpadów płynnych powstających w procedurze QIAamp DSP Virus pod kątem występowania pozostałości materiałów zakaźnych. Z tego względu podczas pracy z tym produktem należy wdrożyć uniwersalne środki ostrożności dotyczące postępowania z potencjalnie zakaźnym materiałem pochodzenia ludzkiego (stosować rękawiczki, fartuchy laboratoryjne i ochronę oczu), a odpady płynne należy traktować jako materiał zakaźny i postępować z nimi oraz usuwać je zgodnie z lokalnymi przepisami bezpieczeństwa.

Następujące zwroty wskazujące zagrożenia i środki ostrożności obowiązują dla składników zestawu QIAamp DSP Virus Kit.

Bufor AL



Zawiera: chlorowodorek guanidyny, kwas maleinowy. Uwaga! Może działać szkodliwie po połknięciu lub w następstwie wdychania. Działa drażniąco na skórę. Może powodować reakcję alergiczną skóry. Powoduje poważne podrażnienie oczu. Nosić rękawice ochronne/odzież ochronną/okulary ochronne/ochronę twarzy.

Bufor AW1



Zawiera: chlorowodorek guanidyny. Uwaga! Działa szkodliwie po połknięciu lub w następstwie wdychania. Działa drażniąco na skórę. Powoduje poważne podrażnienie oczu. Nosić rękawice ochronne/odzież ochronną/okulary ochronne/ochronę twarzy.

Proteaza firmy QIAGEN



Zawiera: subtylizynę. Niebezpieczeństwo! Działa szkodliwie po połknięciu. Działa drażniąco na skórę. Powoduje poważne uszkodzenie oczu. Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. Może działać drażniąco na drogi oddechowe. Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgietki/oparów/rozpylonej cieczy. Nosić rękawice ochronne/odzież ochronną/okulary ochronne/osłonę twarzy. Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są założone i można to łatwo wykonać. Kontynuować płukanie. W przypadku narażenia lub styczości: Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem. Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie.

Wstęp

Zestaw QIAamp DSP Virus Kit wykorzystuje powszechnie znaną technologię do jednoczesnej izolacji i oczyszczania wirusowego DNA i RNA. Procedura QIAamp DSP Virus łączy właściwości selektywnego wiązania membrany krzemionkowej z minimalnymi objętościami elucji wynoszącymi 20 µl lub 60 µl.

Procedura ta nadaje się do stosowania z osoczem lub surowicą, które mogą zawierać cytrynian lub EDTA. Próbkami mogą być świeże, liofilizowane lub zamrożone, pod warunkiem że nie były zamrażane i rozmrażane więcej niż raz. Procedurę można stosować do izolacji wirusowego RNA i DNA szerokiej gamy wirusów RNA i DNA. Procedura została zaprojektowana w taki sposób, aby możliwe było uniknięcie zanieczyszczenia krzyżowego między próbkami, i pozwala na bezpieczne postępowanie z potencjalnie zakaźnymi próbkami. Procedura jest wysoce odpowiednia do jednoczesnego przetwarzania wielu próbek. Wirusowe kwasy nukleinowe są eluowane buforem do elucji (AVE), gotowe do użycia w reakcjach amplifikacji lub przechowywania w temperaturze -20°C .

Zasada i procedura

Procedura QIAamp DSP Virus składa się z 4 etapów:

- liza cząstek wirusowych w próbce;
- wiązanie wirusowych kwasów nukleinowych w lizacie do membrany kolumny QIAamp MinElute;
- płukanie membrany;
- elucja wirusowych kwasów nukleinowych z membrany.

Procedura jest przeprowadzana przy użyciu kolumn QIAamp MinElute na kolektorze próżniowym.

Liza cząstek wirusowych

Próbki poddawane są lizie w warunkach denaturujących w podwyższonych temperaturach. Liza zachodzi w obecności proteazy firmy QIAGEN (QP) i buforu do lizy (AL), które wspólnie zapewniają inaktywację RNaz.

Wiązanie kwasów nukleinowych do membrany kolumny QIAamp MinElute

W celu optymalizacji wiązania wirusowego DNA i RNA do membrany kolumny QIAamp MinElute do lizatów dodaje się najpierw etanol. Każdy lizat nanosi się następnie na kolumnę QIAamp MinElute, a wirusowe kwasy nukleinowe ulegają adsorpcji na membranie krzemionkowej w miarę przesączania lizatu pod wpływem ciśnienia próżni.

Usuwanie pozostałości zanieczyszczeń

Podczas gdy wirusowe kwasy nukleinowe pozostają związane z membraną kolumny QIAamp MinElute, zanieczyszczenia są skutecznie wypłukiwane za pomocą najpierw buforu do płukania 1 (AW1), następnie buforu do płukania 2 (AW2) i wreszcie etanolu.

Elucja czystych kwasów nukleinowych

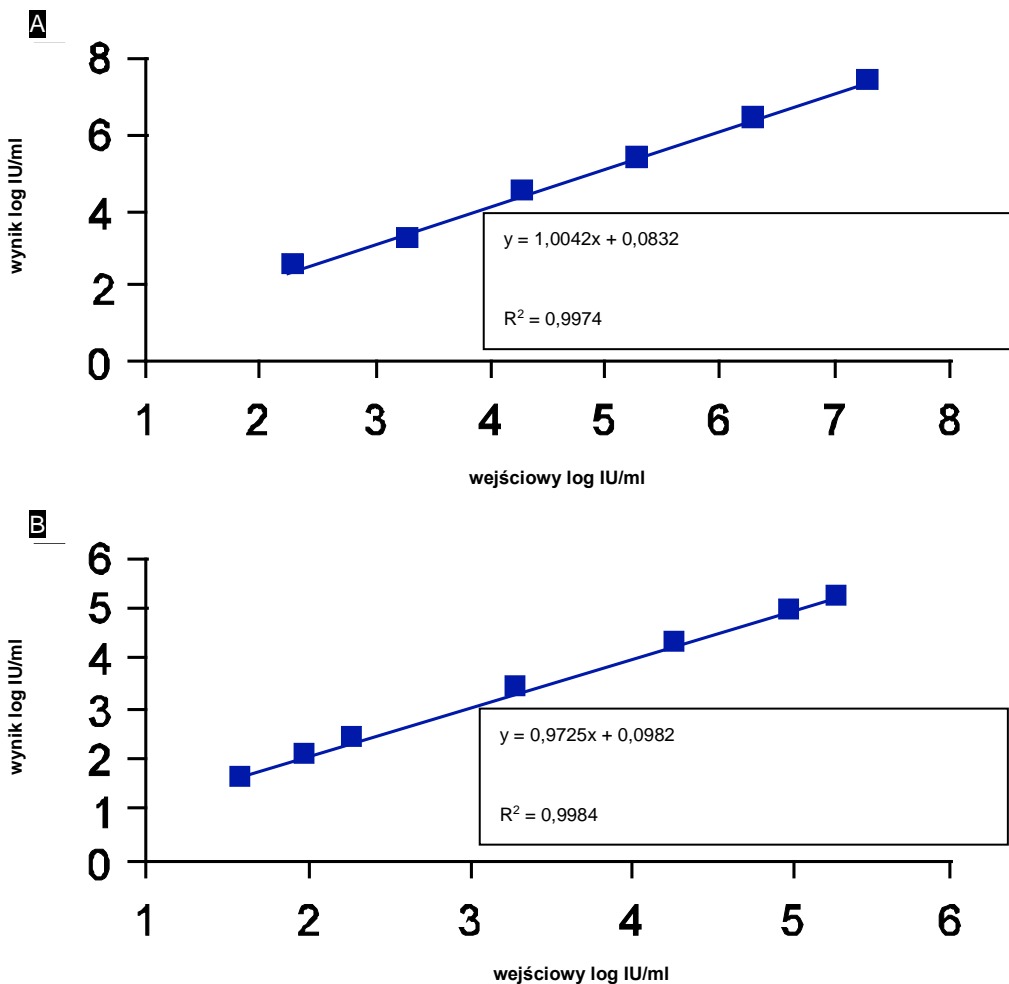
Wirusowe kwasy nukleinowe są eluowane z membrany kolumny QIAamp MinElute za pomocą buforu do elucji (AVE). Kolumny QIAamp MinElute umożliwiają stosowanie objętości elucji wynoszących 20 µl lub 60 µl.

Parametry skuteczności

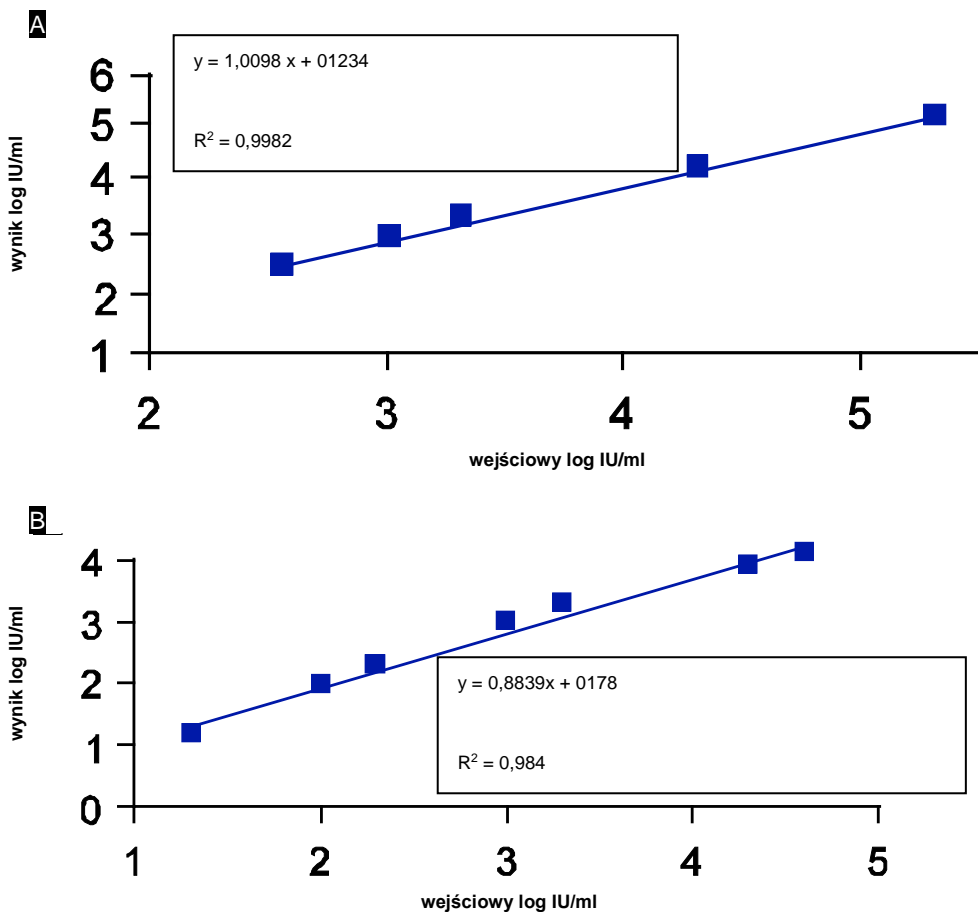
Określono liniowy zakres procedury QIAamp DSP Virus dla RNA wirusa HIV i DNA wirusa HBV w kilku dalszych

Tabela 1. Dalsze oznaczenia diagnostyczne, w których przetestowano liniowy zakres procedury QIAamp DSP Virus

Oznaczenie	Zestaw
Reakcja RT-PCR w czasie rzeczywistym wykrywająca RNA wirusa HIV	Oznaczenie TaqMan® i test cobas® AMPLICOR HIV-1 MONITOR® Test
Reakcja PCR w czasie rzeczywistym wykrywająca DNA wirusa HBV	Oznaczenie TaqMan i test cobas AMPLICOR HBV MONITOR® Test



Ryc. 1. Zakres liniowy procedury QIAamp DSP Virus przy użyciu oznaczeń TaqMan. Zakres liniowy procedury QIAamp DSP Virus przy objętości elucji 60 µl określono przy użyciu oznaczeń TaqMan na **A** RNA wirusa HIV i **B** DNA wirusa HBV.



Ryc. 2. Zakres liniowy procedury QIAamp DSP Virus przy użyciu testów cobas AMPLICOR MONITOR. Zakres liniowy procedury QIAamp DSP Virus przy objętości elucji 60 μ l określono przy użyciu testów cobas AMPLICOR MONITOR Test na **A** RNA wirusa HIV i **B** DNA wirusa HBV.

Granice wykrywalności (detection limit, DL) i granice oznaczalności (quantification limit, QL) zgodnie z wytycznymi ICH 2QA i 2QB określono dla procedury QIAamp DSP Virus (przy początkowej objętości próbki 500 µl i objętościach elucji 20 µl i 60 µl) przy użyciu różnych dalszych oznaczeń diagnostycznych (Tabela 2 i Tabela 3).

Tabela 2. Granica wykrywalności procedury QIAamp DSP Virus

Oznaczenie	Objętość elucji	95-procentowy punkt odcięcia
<i>artus</i> [®] RealArt™ HBV DNA	20 µl	2,31 IU/ml (n=240)
<i>artus</i> RealArt HCV RNA	20 µl	24,31 IU/ml (n=192)
AMPLICOR manual HIV RNA	60 µl	90,92 IU/ml (n=209)
TaqMan HBV DNA	60 µl	4,73 IU/ml (n=192)

Tabela 3. Granica oznaczalności procedury QIAamp DSP Virus

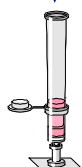
Oznaczenie	QL	CV
TaqMan HBV DNA	5,7 IU/ml	<70% (n=88)
TaqMan HIV RNA	52 IU/ml	<60% (n=88)
cobas AMPLICOR HIV RNA	100 IU/ml	<60% (n=88)
cobas AMPLICOR HBV DNA	30 IU/ml	<60% (n=88)
cobas AMPLICOR HCV RNA [®]	700 IU/ml	<60% (n=66)

Procedura QIAamp DSP Virus

Próbka



Liza



Wiązanie

Próżnia



**Płukanie
(AW1)**

**Zdjęcie przedłużacza
EXT przed
zastosowaniem próżni**

Próżnia



**Płukanie
(AW2)**



Próżnia

**Płukanie
(etanol)**

Próżnia



**Odwiro-
wanie do
sucha**

Elucja



**Czyste wirusowe kwasy
nukleinowe**

Przed rozpoczęciem należy dokładnie przeczytać protokół (strona 28).
Do próbki LT dodać 75 µl proteazy QP, 500 µl próbki i 500 µl buforu AL.
Wytząsać przez 15 sekund.
Inkubować przez 15 minut (± 1 min) w temperaturze 56°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).
Dodać 600 µl etanolu.
Wytząsać przez 15 sekund.
Inkubować przez 5 min (± 1 minuta) w temperaturze pokojowej (15–25°C).

Przenieść lizat na kolumnę QIAamp MinElute z podłączonym przedłużaczem EXT.

Dodać 600 µl zrekonstruowanego buforu AW1.

Zdjąć przedłużacz EXT.

Dodać 700 µl zrekonstruowanego buforu AW2.

Dodać 750 µl etanolu.

Umieścić kolumnę QIAamp MinElute w próbówce WT.
Wirować przez 1 minutę przy 14 000 rpm.
Umieścić kolumnę QIAamp MinElute w próbówce WT.
Inkubować przez 3 minuty w temperaturze 56°C.
Umieścić kolumnę QIAamp MinElute w próbówce ET.
Dodać 20 µl lub 60 µl buforu AVE.
Inkubować przez 3 minuty w temperaturze pokojowej.
Wirować przez 1 minutę przy 14 000 rpm.

Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

- Etanol (96–100%)
- Pipety* i końcówki do pipet (aby nie dopuścić do zanieczyszczenia krzyżowego zdecydowanie zalecamy używanie końcówek do pipet z barierami aerozolowymi)
- Rękawiczki jednorazowe
- Blok grzewczy* do lizy próbek w temperaturze 56°C (zalecamy produkt Eppendorf® Thermomixer comfort z termoblokiem na mikropróbki testowe o pojemności 2,0 ml[†])
- Mikrowirówka*
- Cylinder miarowy (50 ml)
- Wytrząsarka
- System QIAvac 24 Plus vacuum system (QIAvac 24 Plus, nr kat. 19413, system QIAvac Connecting System, nr kat. 19419 i pompa Vacuum Pump, nr kat. 84020[‡]) lub równoważny laboratoryjny system próżniowy


* W celu zapewnienia właściwego przetwarzania próbek w procedurze QIAamp DSP Virus zdecydowanie zalecamy kalibrowanie sprzętu (np. pipet i bloków grzewczych) zgodnie z zaleceniami producenta.

[†] Nie jest to pełna lista dostawców i nie obejmuje wielu ważnych sprzedawców materiałów biologicznych.

[‡] Nr kat. 84020 odnosi się do pompy odpowiedniej dla krajów europejskich (np. Niemiec). W przypadku krajów, w których obowiązują inne wymagania dotyczące napięcia lub wtyczek, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy QIAGEN.

Ważne informacje

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Po otrzymaniu zestawu należy sprawdzić składniki zestawu pod kątem uszkodzeń. Jeśli uszkodzone są opakowania blistrowe lub butelki z buforami, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem. W przypadku rozlania płynów należy zapoznać się z częścią „Uwagi i środki ostrożności” (strona 8).
- Nie używać uszkodzonych składników zestawu, ponieważ ich użycie może prowadzić do słabego działania zestawu.
- Należy zawsze stosować sprzęt niezawierający RNaz.
- Podczas procedury etanol (96–100%) należy przechowywać na lodzie.
- Należy zawsze zmieniać końcówki pipet pomiędzy przenoszeniami płynów. W celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego zalecamy stosowanie końcówek do pipet z barierą aerozolową.
- Wszystkie etapy odwirowywania należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej (15–25°C).
- Należy zawsze używać rękawiczek jednorazowych i regularnie sprawdzać, czy nie są zanieczyszczone materiałem próbki.
- Należy wyrzucić rękawiczki, jeśli będą zanieczyszczone lub przynajmniej podczas wszystkich etapów oznaczonych symbolem rękawiczki. 
- W celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego należy otwierać tylko jedną próbkę naraz.
- Nie używać składników innych zestawów z aktualnie używanym zestawem, chyba że numery serii są identyczne.
- Należy unikać zanieczyszczenia mikrobiologicznego odczynników zestawu.

- W celu zapewnienia bezpieczeństwa przed materiałem potencjalnie zakaźnym zalecamy pracę w warunkach laminarnego przepływu powietrza do czasu lizy próbek.
- Zestaw powinien być stosowany wyłącznie przez personel przeszkolony w zakresie laboratoryjnych procedur diagnostyki in vitro.
- Procedura zawiera instrukcje dotyczące przetwarzania pojedynczej próbki osocza lub surowicy. W systemie próżniowym QIAvac 24 Plus można jednak przetwarzać do 24 próbek jednocześnie.

Przygotowanie RNA

Przygotowując wirusowe RNA, należy szybko pracować podczas ręcznych etapów procedury.

Bufor do elucji (AVE) zawiera azydek sodu*, środek przeciwbakteryjny zapobiegający rozwojowi organizmów produkujących RNazy. Ponieważ jednak bufor ten nie zawiera żadnych substancji chemicznych powodujących degradację RNaz, nie będzie aktywnie hamował RNaz wprowadzonych wskutek nieprawidłowego postępowania. Należy zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć zanieczyszczenia buforu do elucji (AVE) RNazami.

Przechowywanie próbek

Po pobraniu i odwirowaniu osocze i surowicę można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maks. 6 godzin. W celu długotrwałego przechowywania zalecane jest zamrożenie próbek w porcjach w temperaturze –20°C lub –80°C. Zamrożonych próbek osocza lub surowicy nie wolno rozmrażać więcej niż raz. Wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie prowadzi do denaturacji i wytrącania białek, co powoduje zmniejszenie miana wirusów i z tego powodu zmniejszone uzyski wirusowych kwasów nukleinowych. Ponadto krioprecypitaty powstałe podczas zamrażania-rozmrażania zatykają membranę kolumny

* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych.

QIAamp MinElute. Jeśli krioprecypitaty są widoczne, należy je zebrać przez odwirowanie przy około 6800 x *g* przez 3 minuty. Oczyszczony supernatant należy zaaspirować i natychmiast poddać przetworzeniu bez naruszania osadu.

Przygotowanie odczynników i buforów

Przygotowanie proteazy firmy QIAGEN

Dodać całą zawartość fiolki zawierającej 4,4 ml rozpuszczalnika proteazy (PS) do fiolki z liofilizowaną proteazą firmy QIAGEN (QP) i ostrożnie wymieszać. Aby uniknąć spieniania, wymieszać zawartość fiolki, odwracając ją kilka razy. Upewnić się, że proteaza firmy QIAGEN (QP) jest całkowicie rozpuszczona.



Nie dodawać proteazy firmy QIAGEN (QP) bezpośrednio do buforu do lizy (AL).

Dodanie nośnika RNA i kontroli wewnętrznej do buforu do lizy

Nośnik RNA służy dwóm celom. Po pierwsze wzmacnia wiązanie wirusowych kwasów nukleinowych do membrany kolumny QIAamp MinElute, zwłaszcza jeśli w próbce jest bardzo mało cząsteczek docelowych. Po drugie dodanie dużych ilości nośnika RNA zmniejsza prawdopodobieństwo degradacji wirusowego RNA w rzadkich przypadkach, gdy cząsteczki RNazy nie ulegną denaturacji pod wpływem soli chaotropowych i detergentu zawartego w buforze do lizy (AL). Jeśli do buforu do lizy (AL) nie jest dodany nośnik RNA, może to prowadzić do zmniejszonego odzysku wirusowego RNA lub DNA.

Nośnik RNA może również znajdować się w niektórych odczynnikach kontroli wewnętrznej w dostępnych w handlu dalszych oznaczeniach. W takich przypadkach należy zapoznać się z odpowiednimi instrukcjami obsługi podanymi przez producenta dalszego oznaczenia.

W przypadku stosowania zestawu QIAamp DSP Virus Kit w połączeniu z diagnostycznymi systemami amplifikacji usilnie zaleca się stosowanie kontroli wewnętrznej. Kontrolę

wewnętrzna RNA lub DNA oraz zrekonstruowany nośnik RNA należy dodać do buforu do lizy (AL) i dokładnie wymieszać poprzez odwrócenie próbki 10 razy. W celu uniknięcia spienienia nie używać wytrząsarki.

W celu ustalenia optymalnego stężenia kontroli wewnętrznej należy zapoznać się z instrukcjami producenta. Zastosowanie innego stężenia niż zalecane może prowadzić do nieprawidłowych wyników. Podczas obliczania prawidłowej ilości kontroli wewnętrznej do użycia należy uwzględnić objętość początkową próbki i objętość elucji. Należy pamiętać, że zestaw QIAamp DSP Virus Kit wykorzystuje objętość początkową 500 µl.

W celu przygotowania roztworu nośnika RNA należy dodać 310 µl buforu do elucji (AVE) do próbki zawierającej 310 µg liofilizowanego nośnika RNA, aby uzyskać roztwór o stężeniu 1 µg/µl. Dokładnie rozpuścić nośnik RNA, podzielić na równe porcje wygodnej wielkości i przechowywać w temperaturze -20°C . Nie zamrażać i nie rozmrażać porcji nośnika RNA więcej niż 2 razy.

Należy zwrócić uwagę, że nośnik RNA nie rozpuszcza się w buforze do lizy (AL). Należy go najpierw rozpuścić w buforze do elucji (AVE), a następnie dodać do buforu do lizy (AL). Przed wymieszaniem z buforem do lizy (AL) należy sprawdzić, czy nośnik RNA jest całkowicie rozpuszczony w prawidłowej objętości buforu do elucji (AVE).



Należy zawsze stosować prawidłową kontrolę wewnętrzną w dalszym oznaczeniu. Więcej informacji zawiera instrukcja producenta.

Obliczyć objętość mieszaniny bufor do lizy (AL)/nośnik RNA potrzebnej na partię próbek, wybierając liczbę próbek, które mają być jednocześnie przetwarzane, z tabeli Tabela 4. Objętości oblicza się przy użyciu następującego wzoru do obliczania próbek:

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

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

gdzie: **n** = liczba próbek do jednoczesnego przetworzenia

y = obliczona objętość buforu do lizy (AL)

z = objętość mieszaniny nośnik RNA/bufor do elucji (AVE) do dodania do buforu do lizy (AL)

Tabela 4. Objętości buforu do lizy (AL) i mieszaniny nośnik RNA/bufor do elucji (AVE) wymagane do procedury QIAamp DSP Virus

Liczba próbek	Obj. buforu AL (ml)	Obj. mieszaniny nośnik RNA/AVE (μl)	Liczba próbek	Obj. buforu AL (ml)	Obj. mieszaniny nośnik 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

Przygotowanie buforu do płukania 1 (AW1)

Za pomocą cylindra miarowego należy dodać 25 ml etanolu (96–100%) do butelki zawierającej 19 ml koncentratu buforu do płukania 1 (AW1). Zrekonstruowany bufor do płukania 1 (AW1) należy przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C).



Przed rozpoczęciem procedury należy zawsze wymieszać zrekonstruowany bufor do płukania 1 (AW1), odwracając butelkę kilka razy.

Przygotowanie buforu do płukania 2 (AW2)

Za pomocą cylindra miarowego należy dodać 30 ml etanolu (96–100%) do butelki zawierającej 13 ml koncentratu buforu do płukania 2 (AW2). Zrekonstruowany bufor do płukania 2 (AW2) należy przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C).



Przed rozpoczęciem procedury należy zawsze wymieszać zrekonstruowany bufor do płukania 2 (AW2), odwracając butelkę kilka razy.

Przygotowanie buforu do elucji (AVE)

Zestaw zawiera cztery próbki buforu do elucji (AVE). Należy uważać, aby nie zanieczyścić buforu RNazami. Jeśli przy użyciu jednego zestawu przeprowadza się nie więcej niż 4 procedury oczyszczania, zalecamy, aby wyrzucić próbkę z buforem do elucji (AVE) po zakończeniu każdej procedury.

Elucja wirusowych kwasów nukleinowych

W przypadku dalszych zastosowań wymagających małych objętości początkowych (np. niektóre oznaczenia PCR i RT-PCR) stosowanie wirusowych kwasów nukleinowych eluowanych w 20 µl buforu do elucji (AVE) może zwiększyć czułość testu.

Objętość wirusowych kwasów nukleinowych eluowanych z kolumny QIAamp MinElute może być do 5 µl mniejsza niż objętość buforu do elucji (AVE) naniesionego na kolumnę. Przykładowo elucja wirusowych kwasów nukleinowych za pomocą 60 µl buforu do elucji (AVE) prowadzi do uzyskania około 55 µl eluatu, a elucja za pomocą 20 µl prowadzi do uzyskania około 15 µl eluatu.

Objętość odzyskanego eluatu jest zależna od właściwości próbki. Jeśli objętość odzyskanego eluatu jest zbyt mała dla dalszego oznaczenia, należy zwiększyć objętość poprzez dodanie większej ilości buforu do elucji (AVE).

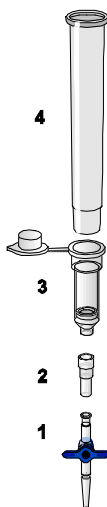
Wirusowe kwasy nukleinowe poddane elucji należy zebrać w probówkach do elucji (ET). W przypadku przechowywania wirusowych kwasów nukleinowych przez okres do 24 godzin zalecamy przechowywanie w temperaturze 2–8°C.

Uzysk i jakość wirusowych kwasów nukleinowych

Uzysk i jakość wyizolowanych kwasów nukleinowych są odpowiednie dla wszystkich rodzajów dalszych procedur detekcji w diagnostyce molekularnej. Oznaczenia diagnostyczne należy wykonywać zgodnie z instrukcjami producenta.

Ustawianie systemu próżniowego QIAvac 24 Plus

Należy zapewnić prawidłowe ustawienie przedłużacza kolumny (EXT), kolumny QIAamp MinElute, złącza VacConnector (VC) oraz zaworu VacValve (patrz Ryc. 3).



Ryc. 3. Montaż składników zestawu QIAamp DSP Virus Kit do próżniowego przetwarzania próbek:

1: Zawór VacValve (dostarczany z systemem próżniowym)

2: Złącze VacConnector (VC)

3: Kolumna QIAamp MinElute

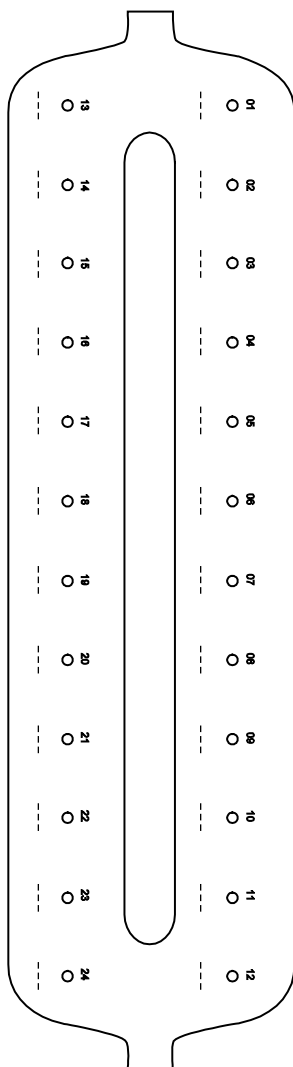
4: Przedłużacz kolumny (EXT)

Zalecamy oznakowanie probówek do lizy (LT), probówek do elucji (ET) i kolumn QIAamp MinElute do stosowania w systemie próżniowym QIAvac 24 Plus zgodnie ze schematem na Ryc. 4, aby uniknąć pomylenia próbek. Można skopiować tę rycinę i oznakować nazwami próbek.

Data: _____

Operator: _____

ID reakcji: _____



Ryc. 4. Schemat oznakowania probówek do lizy (LT), probówek do elucji (ET) i kolumn QIAamp MinElute do stosowania w systemie próżniowym QIAvac 24 Plus.

Protokół: Izolacja i oczyszczanie wirusowych kwasów nukleinowych z osocza i surowicy

Do izolacji i oczyszczania wirusowych kwasów nukleinowych z 500 µl osocza lub surowicy pobranych na EDTA lub cytrynian.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Doprowadzić próbki do temperatury pokojowej (15–25°C) i upewnić się, że są dobrze wymieszane.
- Dodać nośnik RNA zrekonstruowany w buforze do elucji (AVE) lub kontrolę wewnętrzną do buforu do lizy (AL) zgodnie z instrukcjami na stronie 20.
- Upewnić się, że bufony do płukania 1 (AW1) i 2 (AW2) oraz proteaza firmy QIAGEN (QP) zostały przygotowane zgodnie z instrukcjami w części „Ważne informacje” na stronie 18.
- Doprowadzić bufor do elucji (AVE) do temperatury pokojowej (15–25°C) do użycia w etapie 18. W miarę możliwości stosować świeży bufor do elucji (AVE) do każdej procedury (dostarczone są 4 probówki).
- Ustawić blok grzewczy na temperaturę 56°C do użytku w etapach 4 i 17.
- Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, włożyć złącze VacConnector (VC) do każdego adaptera typu luer systemu próżniowego.
- Upewnić się, że butelka na odpady systemu próżniowego jest pusta i że wszystkie złącza są prawidłowo podłączone.
- Szczegółowe informacje dotyczące obsługi systemu próżniowego, zwłaszcza jego konserwacji, zawiera dostarczona razem z nim instrukcja obsługi.

Procedura

1. Za pomocą pipety przenieść 75 µl proteazy firmy QIAGEN (QP) do próbki do lizy (LT).



Przed użyciem należy sprawdzić termin ważności rekonstruowanej proteazy.

2. Dodać 500 µl osocza lub surowicy do próbki do lizy (LT).
3. Dodać 500 µl buforu do lizy (AL) (zawierającego nośnik RNA w stężeniu 11,2 µg/ml) do próbki do lizy (LT), zamknąć wieczko i wymieszać, wytrząsając pulsacyjnie przez 15 sekund.

Aby zapewnić skuteczną lizę, kluczowe jest, aby próbka i bufor do lizy (AL) były dobrze wymieszane i tworzyły roztwór jednorodny.



Bufer do lizy (AL) zawiera kontrolę wewnętrzną. Ponieważ bufor do lizy (AL) ma dużą lepkość, należy dodać właściwą objętość buforu do lizy (AL), przenosząc go ostrożnie pipetą lub stosując odpowiednią pipetę, taką jak pipeta wieloetapowa Eppendorf lub równoważna.



Nie dodawać proteazy firmy QIAGEN (QP) bezpośrednio do buforu do lizy (AL).

4. Inkubować w temperaturze 56°C (±1°C) przez 15 minut (±1 min).
5. Wirować próbkę do lizy (LT) przez ≥5 sekund przy pełnej prędkości, aby usunąć krople z wnętrza wieczka.



6. Zmienić rękawiczki i otworzyć ostrożnie próbkę do lizy (LT).

7. Dodać 600 µl etanolu (96–100%) do próbki do lizy (LT), zamknąć wieczko i dokładnie wymieszać, wytrząsając pulsacyjnie przez ≥15 sekund. Inkubować przez 5 minut (±1 minuta) w temperaturze pokojowej (15–25°C).
8. Wirować próbkę do lizy (LT) przez ≥5 sekund przy pełnej prędkości, aby usunąć krople z wnętrza wieczka.

9. Włożyć kolumnę QIAamp MinElute do złącza VacConnector (VC) w systemie próżniowym (patrz Ryc. 3, strona 25). Włożyć przedłużacz kolumny (EXT) do otwartej kolumny QIAamp MinElute.
-  Zachować probówkę do płukania (WT) w celu odwirowania do sucha w etapie 16.
-  10. Zmienić rękawiczki i otwierać tylko jedną probówkę naraz.
11. Ostrożnie nanieść cały lizat z etapu 7 na przedłużacz kolumny (EXT) kolumny QIAamp MinElute bez zamaczania brzegu. Unikać dotykania membrany kolumny QIAamp MinElute końcówką pipety.
12. Włączyć pompę próżniową. Po przejściu lizatu przez kolumnę QIAamp MinElute należy otworzyć zawór systemu próżniowego i zwolnić próżnię.
- Jeśli jednocześnie przetwarzanych jest kilka kolumn QIAamp MinElute, zalecamy zamknięcie zaworu VacValve każdej kolumny po przejściu lizatu, aby skrócić czas trwania tego etapu próżniowego.
-  Jeśli lizat nie przeszedł całkowicie przez membranę w ciągu 15 minut, należy wyrzucić kolumnę QIAamp MinElute i powtórzyć procedurę z nową próbką.
-  W celu szybkiego zwolnienia ciśnienia próżni należy użyć zaworu systemu próżniowego.
13. Nanieść 600 µl buforu do płukania 1 (AW1) na kolumnę QIAamp MinElute. Ostrożnie wyjąć i wyrzucić przedłużacz kolumny (EXT), a następnie zamknąć zawór systemu próżniowego. Po przejściu buforu do płukania 1 (AW1) przez kolumnę QIAamp MinElute otworzyć zawór i zwolnić próżnię.
-  W celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego należy zadbać, aby wyciągnięte przedłużacze kolumn (EXT) nie były przenoszone nad sąsiadującymi kolumnami QIAamp MinElute.
14. Nanieść 750 µl buforu do płukania 2 (AW2) na kolumnę QIAamp MinElute bez zamaczania brzegu. Unikać dotykania membrany kolumny QIAamp MinElute końcówką

pipety. Pozostawić otwarte wieczko kolumny i zamknąć zawór systemu próżniowego. Po przejściu buforu do płukania 2 (AW2) przez kolumnę QIAamp MinElute otworzyć zawór i zwolnić próżnię.

15. Nanieść 750 µl etanolu (96–100%) na kolumnę QIAamp MinElute bez zamaczania brzegu. Unikać dotykania membrany kolumny QIAamp MinElute końcówką pipety. Pozostawić otwarte wieczko kolumny i zamknąć zawór systemu próżniowego. Po przejściu etanolu przez kolumnę QIAamp MinElute otworzyć zawór i zwolnić próżnię.



Do nanoszenia etanolu na kolumnę QIAamp MinElute należy stosować końcówki do pipet z barierą aerozolu.

16. Zamknąć wieczko kolumny QIAamp MinElute, wyjąć ją z systemu próżniowego i wyrzucić złącze VacConnector (VC). Umieścić kolumnę QIAamp MinElute w próbówce do płukania (WT), zachowanej w etapie 9, i odwirować przy pełnej prędkości (około 20 000 x g lub 14 000 rpm) przez 1 min, aby całkowicie osuszyć membranę. Wyrzucić próbkę do płukania (WT) zawierającą przesącz.



Pominięcie odwirowania do sucha może spowodować inhibicję dalszego oznaczenia.

17. Umieścić kolumnę QIAamp MinElute w nowej próbówce do płukania (WT) i inkubować z otwartym wieczkiem w temperaturze 56°C przez 3 minuty, aby odparować pozostały płyn.
18. Umieścić kolumnę QIAamp MinElute w czystej próbówce do elucji (ET) i wyrzucić próbkę do płukania (WT). Ostrożnie otworzyć wieczko kolumny QIAamp MinElute i nanieść 20 µl lub 60 µl buforu do elucji (AVE) (w zależności od dalszego oznaczenia) na środek membrany. Zamknąć wieczko i inkubować w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez ≥ 3 minuty. Wirować przy pełnej prędkości (około 20 000 x g lub 14 000 rpm) przez 1 minutę w celu elucji wirusowych kwasów nukleinowych.



Po zakończeniu tego protokołu należy postępować według procedury konserwacji dla systemu próżniowego (więcej informacji zawiera instrukcja obsługi dostarczona razem z systemem próżniowym).

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika produktów QIAGEN są dostępne pod adresem www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Historia zmian

Historia zmian dokumentu

R3 08/2018	Dodano wyjaśniający przypis dotyczący nr kat. pompy Vacuum Pump, patrz strona 17. Zaktualizowano ostrzeżenia i środki ostrożności. Zaktualizowano format instrukcji obsługi.
---------------	--

Strona celowo pozostawiona pusta

Strona celowo pozostawiona pusta

Strona celowo pozostawiona pusta

Umowa ograniczonej licencji dla zestawu QIAamp DSP Virus Kit

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołem dołączonym do produktu oraz niniejszą instrukcją i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania składników niniejszego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu za wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie www.qiagen.com. Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Za wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Ten zestaw i jego składniki posiadają licencję wyłącznie na jednorazowe użycie i nie można ich ponownie używać, regenerować lub sprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań, ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu i ma prawo żądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne dostępne są na stronie www.qiagen.com.

Znaki towarowe: QIAGEN®, QIAamp®, artus®, MinElute® (QIAGEN Group); AMPLICOR HBV MONITOR®, AMPLICOR HCV MONITOR®, AMPLICOR HIV-1 MONITOR®, cobas®, TaqMan® (Roche Group); RealArt™ (artus GmbH); Eppendorf® (Eppendorf AG). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

1114514 08/2018 HB-0109-003 © 2018 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

