

August 2018

Príručka pre QIAamp[®] DSP Virus Kit



QIAamp DSP Virus Kit je všeobecný systém, ktorý využíva technológiu QIAamp na izoláciu a čistenie vírusových nukleových kyselín zo vzoriek ľudskej plazmy alebo séra na diagnostické postupy in vitro.

Na diagnostické použitie in vitro

IVD

CE

REF

60704

i

1114514

QIAGEN logo

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NEMECKO

R3 MAT

1114514SK

Obsah

Obsah súpravy	3
Symboly.....	4
Skladovanie.....	6
Kontrola kvality	6
Účel použitia.....	7
Obmedzenia používania produktu	7
Varovania a preventívne opatrenia.....	8
Úvod	10
Princíp a postup	10
Charakteristiky účinnosti	11
Zariadenie a reagencie, ktoré dodá používateľ	16
Dôležité poznámky	17
Dôležité informácie pred začatím činnosti.....	17
Príprava RNA	18
Skladovanie vzoriek	18
Príprava reagencií a pufrov	19
Elúzia vírusových nukleových kyselín	22
Výťažok a kvalita vírusových nukleových kyselín.....	23
Nastavenie vákuového systému QIAvac 24 Plus	24
Protokol: Izolácia a purifikácia vírusových nukleových kyselín z plazmy a séra	27
História revízií.....	31

Obsah súpravy

QIAamp DSP Virus Kit				60704
Katalógové č.				50
Počet príprav				
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Stĺpce QIAamp MinElute s umývacími skúmavkami) (WT) (2 ml)	COL		50
EXT	Column Extenders (Nadstavce stĺpcov) (3 ml)	COL	EXT	50
ET	Elution Tubes (Elučné skúmavky) (1,5 ml)	ELU	TUBE	50
VC	VacConnectors	VAC	CON	50
LT	Lysis Tubes (Lyzačné skúmavky) (2 ml)	LYS	TUBE	50
WT	Wash Tubes (Premývacie skúmavky) (2 ml)	WASH	TUBE	50
AL	Lysis Buffer (Lyzačný pufer)*	LYS	BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Premývací pufer 1) (koncentrát)	WASH	BUF 1 CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Premývací pufer 2) (koncentrát)	WASH	BUF 2 CON	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
QP	QIAGEN® Protease	QPROT		1 liekovka

* Obsahuje hydrochlorid guanidínu. Nekompatibilné s dezinfekčnými prostriedkami obsahujúcimi bieliadlo.

Na strane 8 nájdete bezpečnostné informácie.

† Obsahuje azid sodný ako konzervačnú látku.

‡ Objem resuspenzie 4,4 ml.

Symbols



Súprava obsahuje reagentie na prípravu 50 vzoriek



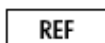
Obráťte sa na údaje uvedené v príručke



Použiť do



Zdravotnícke diagnostické zariadenie na použitie v podmienkach in vitro



Katalógové číslo



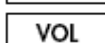
Číslo šarže



Číslo materiálu



Komponenty



Objem



Teplotné obmedzenia



Pri doručení



Dôležitá poznámka



Po kroku protokolu s touto značkou si vymeňte rukavice



Pri doručení otvorte; skladujte stĺpce QIAamp Mini Spin pri 2 – 8 °C



Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)



Po pridaní etanolu do fľaše si zapíšte aktuálny dátum



Pridávanie




Obsahuje



Lyofilizovaný



Rekonštituovať v

EtOH	Etanol
GuHCl	Hydrochlorid guanidínu
MALEIC ACID	Kyselina maleinová
SUBT	Subtilizín
	Vedie k

Skladovanie

Stĺpce QIAamp MinElute by sa mali po príchode skladovať pri teplote 2 – 8 °C.

Všetky pufre je možné skladovať pri izbovej teplote (15 – 25 °C).

Lyofilizovaná nosná RNA sa môže skladovať pri izbovej teplote do dátumu expirácie. Nosná RNA môže byť rozpustená iba v elučnom pufri (AVE); rozpustená nosná RNA sa musí okamžite pridať do lyzačného pufru (AL), ako je uvedené na strane 19. Tento roztok sa musí pripraviť čerstvý a je stabilný pri teplote 2 – 8 °C po dobu až 48 hodín. Nepoužité časti nosnej RNA rozpustenej v elučnom pufri (AVE) sa musia zmraziť v alikvotných podieloch pri -20 °C.

Lyofilizovanú proteázu QIAGEN Protease (QP) je možné skladovať pri izbovej teplote do dátumu expirácie bez zhoršenia vlastností.

Rekonštituovaná proteáza QIAGEN Protease (QP) je stabilná až 1 rok pri skladovaní pri teplote 2 – 8 °C, ale iba do dátumu expirácie.

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.

Kontrola kvality

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

Účel použitia

Súprava QIAamp DSP Virus Kit je všeobecný systém, ktorý využíva technológiu QIAamp na izoláciu a čistenie vírusových nukleových kyselín zo vzoriek ľudskej plazmy alebo séra na diagnostické účely in vitro. Všetky diagnostické výsledky získané pomocou postupu prípravy vzorky v spojení s akýmkoľvek následným diagnostickým testom NAT sa musia interpretovať s ohľadom na ďalšie klinické alebo laboratórne zistenia.

Produkt je určený na použitie profesionálnymi používateľmi, ako sú technici a lekári vyškolení v technikách molekulárnej biológie. Je navrhnutý na použitie s akoukoľvek následnou aplikáciou využívajúcou enzymatickú amplifikáciu alebo inú enzymatickú modifikáciu DNA alebo RNA, po ktorej nasleduje detekcia alebo amplifikácia signálu. Izolované a purifikované vírusové nukleové kyseliny sa môžu použiť v kvalitatívnych (napr. skrínigové vyšetrenie krvi), ako aj v kvantitatívnych (napr. monitorovanie vírusovej záťaže) diagnostických testoch NAT.

Aby sa minimalizovali nepravidelnosti v diagnostických výsledkoch, produkt je určený na použitie s internou kontrolou, ako aj s pozitívnymi a negatívnymi kontrolami počas celého procesu prípravy vzorky, amplifikácie a detekcie vzorky podľa použitého následného testu.

Produkt je určený na použitie s vákuovým systémom QIAvac 24 Plus alebo ekvivalentným vákuovým systémom.

Obmedzenia používania produktu

Súprava nie je určená na použitie s krvou, tkanivom, kostnou dreňou alebo kultivovanými bunkami. Súprava tiež nie je určená na izoláciu a purifikáciu bakteriálnych, plesňových alebo parazitických nukleových kyselín. Účinnosť súpravy pri izolácii a purifikácii vírusových nukleových kyselín z iných bezbunkových telesných tekutín, ako je moč a CSF, sa nehodnotila.

Varovania a preventívne opatrenia

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, zobrazit' a vytlačiť kartu bezpečnostných údajov (KBÚ) pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.

UPOZORNENIE: Nepridávajte bieliace alebo kyslé roztoky 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 kvapalnú odpad generovaný postupom QIAamp DSP Virus na zvyškové infekčné materiály. Pri práci s týmto výrobkom sa preto musia dodržiavať všeobecné preventívne opatrenia (rukavice, laboratórne plášte a ochrana očí) pre zaobchádzanie s potenciálne infekčným materiálom z ľudského zdroja. Tekutý odpad musí byť považovaný za infekčný a manipulácia s ním a jeho likvidácia musí prebiehať v súlade s miestnymi bezpečnostnými predpismi.

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

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.

Buffer 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.

QIAGEN Protease



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. Preneste postihnutého na čerstvý vzduch a ponechajte ho v pokoji v polohe pohodlnej na dýchanie.

Úvod

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

Postup je vhodný na použitie s plazmou alebo sérom; oboje môže obsahovať citrát alebo EDTA. Vzorky môžu byť čerstvé, lyofilizované alebo zmrazené, pokiaľ neboli zmrazené a rozmrazené viac než raz. Postup je možné použiť na izoláciu vírusovej RNA a DNA zo širokej škály RNA a DNA vírusov. Postup je navrhnutý tak, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii medzi vzorkami a aby sa umožnila bezpečná manipulácia s potenciálne infekčnými vzorkami. Postup je veľmi vhodný na súčasné spracovanie viacerých vzoriek. Vírusové nukleové kyseliny sa eluujú v elučnom puffri (AVE), sú pripravené na použitie pri amplifikačných reakciách alebo sa skladujú pri teplote -20 °C.

Princíp a postup

Postup QIAamp DSP Virus obsahuje 4 kroky:

- Lyzovanie vírusových častíc vo vzorke
- Viazanie vírusových nukleových kyselín v lyzáte na membránu stĺpca QIAamp MinElute
- Umývanie membrány
- Elúcia vírusových nukleových kyselín z membrány

Postup sa uskutočňuje pomocou stĺpcov QIAamp MinElute na vákuovom potrubí.

Lyzovanie vírusových častíc

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

Viazanie nukleových kyselín na membránu stĺpca QIAamp MinElute

Na optimalizáciu väzby vírusovej DNA a RNA na membránu stĺpca QIAamp MinElute sa do lyzátovej zmesi pridá etanol. Každý lyzátovej zmesi sa potom aplikuje na stĺpec QIAamp MinElute a vírusové nukleové kyseliny sa adsorbujú na membránu na báze oxidu kremičitého, keď sa lyzátovej zmesi cez ňu ťahá tlakom vákuu.

Odstránenie zvyškových kontaminantov

Zatiaľ čo vírusové nukleové kyseliny zostávajú naviazané na membránu stĺpca QIAamp MinElute, kontaminanty sa účinne odplavia najprv pomocou premývacieho pufru 1 (AW1), potom premývacieho pufru 2 (AW2) a potom etanolu.

Elúcia čistých nukleových kyselín

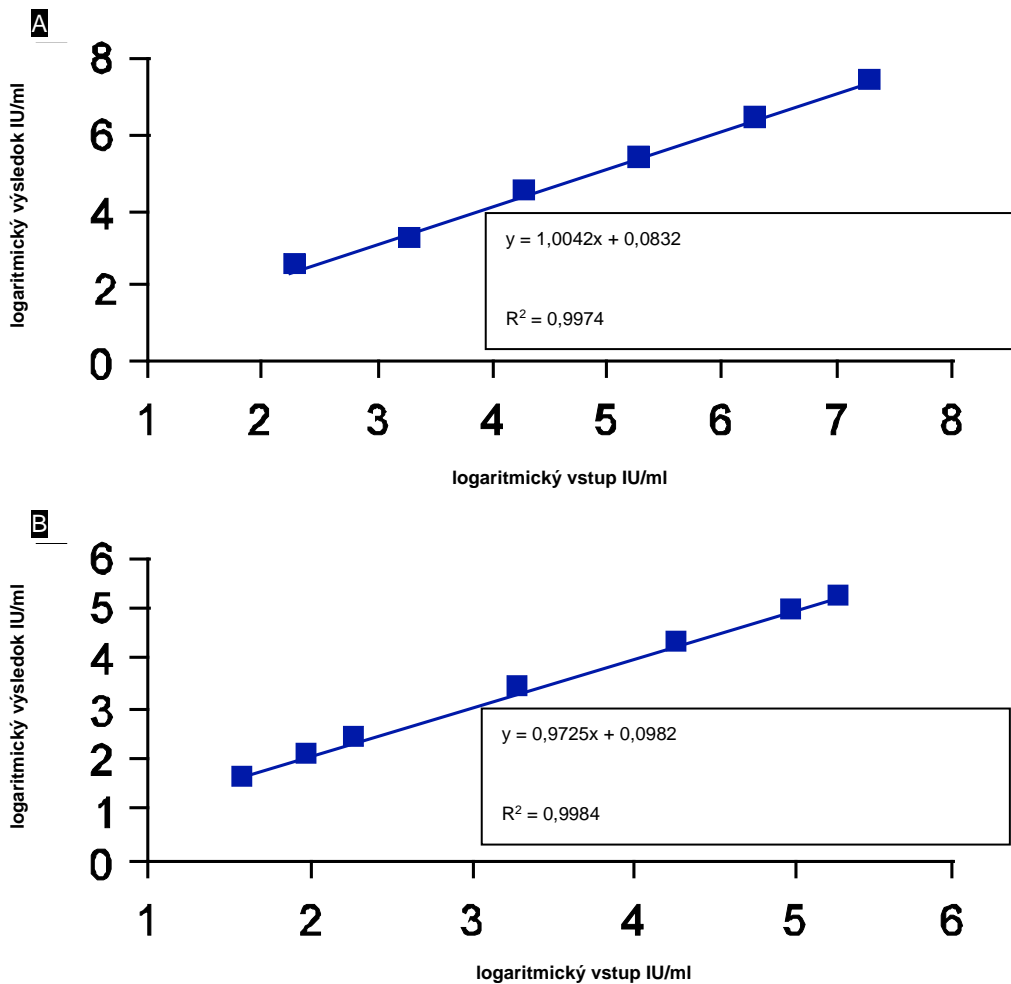
Vírusové nukleové kyseliny sa eluujú z membrány stĺpca QIAamp MinElute pomocou elučného pufru (AVE). Stĺpce QIAamp MinElute umožňujú elučné objemy 20 µl alebo 60 µl.

Charakteristiky účinnosti

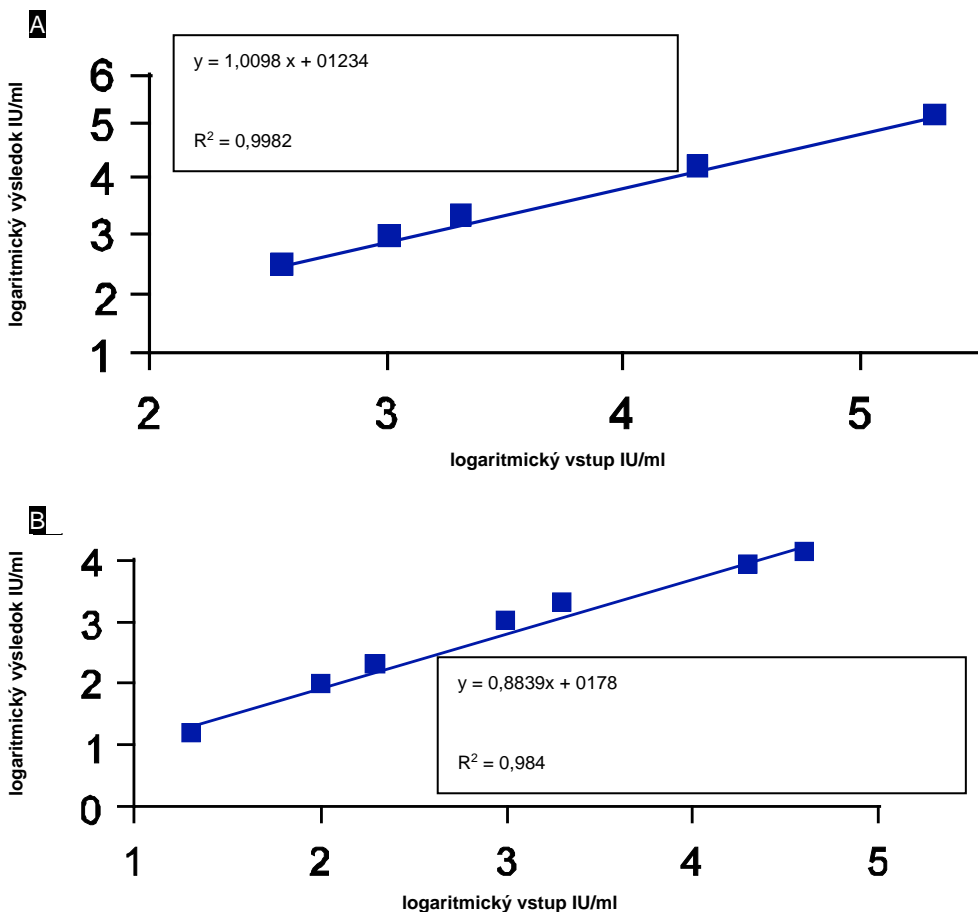
Lineárny rozsah postupu QIAamp DSP Virus bol stanovený pre HIV RNA a HBV DNA v niekoľkých následných diagnostických testoch (Obrázok 1 a Obrázok 2).

Tabuľka 1.- Následné diagnostické testy, v ktorých bol testovaný lineárny rozsah postupu QIAamp DSP Virus

Test	Súprava
Real-time RT-PCR HIV RNA	Test TaqMan® a cobas® AMPLICOR HIV-1 MONITOR® Test
PCR HBV DNA v reálnom čase	Test TaqMan and cobas AMPLICOR HBV MONITOR® Test



Obrázok 1. Lineárny rozsah postupu QIAamp DSP Virus pri použití testov TaqMan. Lineárny rozsah postupu QIAamp DSP Virus pri elučnom objeme 60 μ l bol stanovený pomocou testov TaqMan pre **A** HIV RNA a **B** HBV DNA.



Obrázok 2. Lineárny rozsah postupu QIAamp DSP Virus pri použití testov cobas AMPLICOR MONITOR.
 Lineárny rozsah postupu QIAamp DSP Virus pri elučnom objeme 60 μ l bol stanovený pomocou testov cobas AMPLICOR MONITOR pre **A** HIV RNA a **B** HBV DNA.

Limit detekcie (DL) a limit kvantifikácie (QL) boli podľa pokynov ICH 2QA a 2QB stanovené pre postup QIAamp DSP Virus (s počiatočným objemom vzorky 500 μ l a elučnými objemami 20 μ l a 60 μ l) pomocou rôznych následných diagnostických testov (Obrázok 1 a Obrázok 2).

Tabuľka 2.-Limit detekcie postupu QIAamp DSP Virus

Test	Elučný objem	95 % hraničná hodnota
<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 manuálne HIV RNA	60 µl	90,92 IU/ml (n=209)
TaqMan HBV DNA	60 µl	4,73 IU/ml (n=192)

Tabuľka 3.-Limit kvantifikácie postupu QIAamp DSP Virus

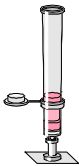
Test	QL	CV
TaqMan HBV DNA	5,7 IU/ml	< 70 % (n=88)
TaqMan HIV RNA	52 IU/ml	< 60 % (n=88)
cobas AMPLICOR HIV RNA	100 IU/ml	< 60 % (n=88)
cobas AMPLICOR HBV DNA	30 IU/ml	< 60 % (n=88)
cobas AMPLICOR HCV RNA [®]	700 IU/ml	< 60 % (n=66)

Postup QIAamp DSP Virus

Vzorka



Lýza



Viazanie

Vákuum



Premyte
(AW1)

Pred aplikáciou vákuua
odstráňte EXT

Vákuum



Premyte
(AW2)

Vákuum



Premyte
(etanol)

Vákuum



Suché
odstreďovanie

Elúcia

Pred začatím si pozorne prečítajte protokol (strana 27).

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

Vírivo miešajte 15 sekúnd.

Inkubujte 15 minút (± 1 min.) pri 56 °C (± 1 °C).

Pridajte 600 µl etanolu.

Vírivo miešajte 15 sekúnd.

Inkubujte 5 min. (± 1 minúta) pri izbovej teplote (15 – 25 °C).

Preneste lyzát do stĺpca QIAamp MinElute s pripojeným EXT.

Pridajte 600 µl rekonstituovaného AW1.

Odstráňte EXT.

Pridajte 700 µl rekonstituovaného AW2.

Pridajte 750 µl etanolu.

Umiestnite stĺpec QIAamp MinElute do WT.

Odstreďujte 1 minútu pri 14 000 ot./min.

Umiestnite stĺpec QIAamp MinElute do WT.

Inkubujte 3 minúty pri 56 °C.

Umiestnite stĺpec QIAamp MinElute do ET.

Pridajte 20 µl alebo 60 µl AVE.

Inkubujte 3 minúty pri izbovej teplote.

Odstreďujte 1 minútu pri 14 000 ot./min.

Čisté vírusové nukleové kyseliny

Zariadenie a reagentie, ktoré dodá používateľ

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

- Etanol (96 – 100 %)
- Pipety* a pipetové hroty (aby sa zabránilo krížovej kontaminácii, dôrazne odporúčame používanie pipetových hrotov s aerosólovými bariérami)
- Jednorazové rukavice
- Ohrievacie teleso* na lýzu vzoriek pri teplote 56 °C (odporúčame Eppendorf® Thermomixer comfort s termoblokem pre testovanie mikroskúmavky s objemom 2,0 ml†)
- Mikrocentrifúga*
- Odmerný valec (50 ml)
- Vortex
- Vákuový systém QIAvac 24 Plus (QIAvac 24 Plus, kat. č. 19413, QIAvac Connecting System, kat. č. 19419 a Vacuum Pump, kat. č. 84020‡), alebo ekvivalentný všeobecný laboratórny vákuový systém


* Aby sa zabezpečilo správne spracovanie vzoriek v postupe QIAamp DSP Virus, dôrazne odporúčame, aby sa prístroje (napr. pipety a ohrievacie telesá) kalibrovali podľa odporúčaní výrobcov.

† Toto nie je úplný zoznam dodávateľov a nezahŕňa mnohých dôležitých dodávateľov biologických materiálov.

‡ Kat. č. 84020 označuje čerpadlo vhodné pre európske krajiny (napr. Nemecko). V krajinách s inými požiadavkami na napätie alebo zástrčky sa obráťte na technický servis spoločnosti QIAGEN.

Dôležité poznámky

Dôležité informácie 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 8).
- Nepoužívajte poškodené komponenty súpravy, pretože ich použitie môže viesť k zhoršenému fungovaniu súpravy.
- Vždy používajte vybavenie bez RNázy.
- Počas postupu skladujte etanol (96 – 100 %) na ľade.
- Medzi prenosmi kvapaliny vždy vymeňte pipetové hroty. Aby ste zabránili krížovej kontaminácii, odporúčame použiť pipetové hroty s aerosólovou bariérou.
- Všetky kroky odstreďovania sa uskutočňujú pri izbovej teplote (15 – 25 °C).
- Vždy používajte jednorazové rukavice a pravidelne kontrolujte, či nie sú kontaminované materiálom vzorky.
- Rukavice zlikvidujte, ak sú kontaminované, a minimálne pri všetkých krokoch označených symbolom rukavíc. 
- Aby ste zabránili krížovej kontaminácii, otvárajte vždy iba jednu skúmavku.
- So súpravou, ktorú práve používate, nepoužívajte komponenty súpravy z iných súprav, ak nie sú čísla šarží rovnaké.
- Zabráňte mikrobiálnej kontaminácii reagensov súpravy.
- Na zaistenie bezpečnosti pred potenciálne infekčným materiálom odporúčame pracovať v podmienkach laminárneho prúdenia vzduchu až do ukončenia lýzy vzoriek.
- Túto súpravu smie používať iba personál vyškolený v diagnostickej laboratórnej praxi in vitro.
- Postup obsahuje pokyny na spracovanie jednej vzorky plazmy alebo séra. Na vákuovom systéme QIAvac 24 Plus je však možné súčasne spracovať až 24 vzoriek.

Príprava RNA

Pri príprave vírusovej RNA pracujte rýchlo počas manuálnych krokov postupu.

Elučný pufer (AVE) obsahuje azid sodný*, antimikrobiálne činidlo, ktoré zabraňuje rastu organizmov produkujúcich RNÁzu. Keďže však tento pufer neobsahuje žiadne chemikálie degradujúce RNÁzu, nebude aktívne inhibovať RNÁzy zavedené nesprávnou manipuláciou. Pri manipulácii s elučným pufrom (AVE) treba dôsledne dbať na to, aby sa zabránilo kontaminácii RNázami.

Skladovanie vzoriek

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 alebo -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 upchajú membránu stĺpca QIAamp MinElute. Ak sú kryoprecipitáty viditeľné, mali by sa granulovať odstredením pri približne 6800 x g po dobu 3 minút. Vyčistený supernatant by sa mal odsať a okamžite spracovať bez narušenia granule.

* Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare.

Príprava reagencií a pufrov

Príprava proteázy QIAGEN Protease

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.



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

Pridanie nosnej RNA a internej kontroly do lyzačného pufru

Nosná RNA slúži na dva účely. Po prvé, zvyšuje väzbu vírusových nukleových kyselín na membránu stĺpca QIAamp MinElute, 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 nie sú denaturované chaotropnými soľami a detergentom v lyzačnom pufru (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 reagentoch internej kontroly komerčných následných testov. V týchto prípadoch si prečítajte príslušný návod na použitie od výrobcu následného testu.

Pri použití súpravy QIAamp DSP Virus Kit v kombinácii s diagnostickými amplifikačnými systémami sa dôrazne odporúča použitie internej kontroly. Interná kontrola RNA alebo DNA a rekonštituovaná nosná RNA by sa mali pridať do lyzačného pufru (AL) a dôkladne premiešať prevrátením skúmavky 10-krát. Aby ste zabránili peneniu, nemiešajte vírivo.

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

Na prípravu roztoku nosnej RNA pridajte 310 µl elučného pufru (AVE) do skúmavky obsahujúcej 310 µg lyofilizovanej nosnej RNA, aby ste získali roztok 1 µg/µl. Nosnú RNA dôkladne rozpustite, rozdeľte ju na alikvóty vhodnej veľkosti a uskladnite pri teplote -20 °C. Alikvóty nosnej RNA nezmrazujte a nerozmrazujte viac ako 2-krát.

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



Pre následný test vždy používajte správnu internú kontrolu. Ďalšie informácie nájdete v pokynoch výrobcov.

Vypočítajte objem zmesi lyzačného pufru (AL)/nosnej RNA potrebný na šaržu vzoriek výberom počtu vzoriek, ktoré sa majú súčasne spracovať, z Tabuľky 4. Objemy sa vypočítajú pomocou tohto vzorového výpočtu:

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

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

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)

Tabuľka 4.- Objemy lyzačného pufru (AL) a nosnej RNA/elučného pufru (AVE) potrebné pre postup QIAamp DSP Virus

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

Príprava premývacieho pufru 1 (AW1)

Pomocou odmerného valca pridajte 25 ml etanolu (96 – 100 %) do fľaše obsahujúcej 19 ml koncentráту premývacieho pufru 1 (AW1). Rekonštituovaný premývací pufer 1 (AW1) skladujte pri izbovej teplote (15 – 25 °C).



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

Príprava premývacieho pufru 2 (AW2)

Pomocou odmerného valca pridajte 30 ml etanolu (96 – 100 %) do fľaše obsahujúcej 13 ml koncentráту premývacieho pufru 2 (AW2). Rekonštituovaný premývací pufer 2 (AW2) skladujte pri izbovej teplote (15 – 25 °C).



Rekonštituovaný premývací 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.

Elúzia vírusových nukleových kyselín

Pre následné aplikácie, ktoré vyžadujú malé počiatočné objemy (napr. niektoré testy PCR a RT-PCR), môže použitie vírusových nukleových kyselín eluovaných v 20 µl elučného pufru (AVE) zvýšiť citlivosť testu.

Objem vírusových nukleových kyselín eluovaných zo stĺpca QIAamp MinElute môže byť až o 5 µl menší ako objem elučného pufru (AVE) aplikovaného na stĺpec. Napríklad elúcia vírusových nukleových kyselín so 60 µl elučného pufru (AVE) vedie k eluátu približne 55 µl, zatiaľ čo elúcia s 20 µl vedie k približne 15 µl eluátu.

Objem regenerovaného eluátu závisí od povahy vzorky. Ak je objem regenerovaného eluátu pre následný test príliš malý, zvýšte objem pridaním väčšieho množstva elučného pufru (AVE).

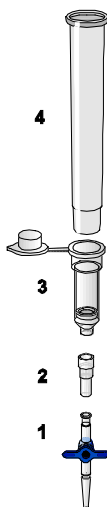
Eluované vírusové nukleové kyseliny sa zhromažďujú v elučných skúmavkách (ET). Ak sa vírusové nukleové kyseliny skladujú do 24 hodín, odporúčame skladovať ich pri teplote 2 – 8 °C.

Výťažok a kvalita vírusových nukleových kyselín

Výťažok a kvalita izolovaných vírusových nukleových kyselín sú vhodné pre všetky typy následných detekčných postupov v molekulárnej diagnostike. Diagnostické testy sa majú vykonávať podľa pokynov výrobcu.

Nastavenie vákuového systému QIAvac 24 Plus

Dbajte na správne nastavenie nastavca stĺpca (EXT), stĺpca QIAamp MinElute, VacConnector (VC) a VacValve (pozri Obrázok 3).



Obrázok 3. Montáž komponentov súpravy QIAamp DSP Virus Kit na vákuové spracovanie vzoriek:

1: VacValve (dodáva sa s vákuovým systémom)

3: Stĺpec QIAamp MinElute

2: VacConnector (VC)

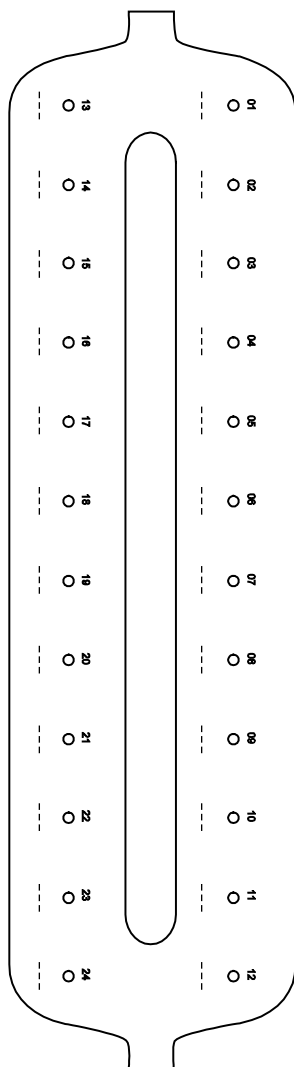
4: Nadstavec stĺpca (EXT)

Odporúčame označiť lyzačné skúmavky (LT), elučné skúmavky (ET) a stĺpce QIAamp MinElute na použitie vo vákuovom systéme QIAvac 24 Plus podľa schémy na Obrázku 4, aby sa zabránilo zámene vzoriek. Tento obrázok môžete kopírovať a označiť názvami vzoriek.

Dátum: _____

Operátor: _____

ID spracovania: _____



Obrázok 4. Schéma označovania pre lyzačné skúmavky (LT), elučné skúmavky (ET) a stĺpce QIAamp MinElute na použitie vo vákuovom systéme QIAvac 24 Plus.

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

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

Veci, ktoré je potrebné vykonať pred začatím

- Vykonajte ekvilibráciu vzoriek na izbovú teplotu (15 – 25 °C) a zabezpečte ich dobré premiešanie.
- Pridajte nosnú RNA rekonštituovanú v elučnom pufrí (AVE) alebo internej kontrole do lyzačného pufru (AL) podľa pokynov na strane 19.
- Uistite sa, že premývací pufer 1 (AW1), premývací pufer 2 (AW2) a proteáza QIAGEN Protease (QP) boli pripravené podľa pokynov v časti „Dôležité poznámky“ na strane 17.
- Vykonajte ekvilibráciu elučného pufru (AVE) na izbovú teplotu (15 – 25 °C) na použitie v kroku 18. Ak je to možné, na každý postup použite čerstvý elučný pufer (AVE) (k dispozícii sú 4 skúmavky).
- Ohrievacie teleso nastavte na teplotu 56 °C na použitie v krokoch 4 a 17.
- Aby ste predišli krížovej kontaminácii, vložte do každého adaptéra Luer vákuového systému VacConnector (VC).
- Skontrolujte, či je fľaša na odpad vákuového systému prázdna a či sú všetky spojky správne pripojené.
- Podrobnosti o prevádzke vákuového systému, najmä o údržbe, nájdete v príručke dodanej s ním.

Postup

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



Pred použitím skontrolujte dátum expirácie rekonštituovanej proteázy.

2. Do lyzačnej skúmavky (LT) pridajte 500 µl plazmy alebo séra.
3. Do lyzačnej skúmavky (LT) pridajte 500 µl lyzačného pufru (AL) (ktorý obsahuje 11,2 µg/ml nosnej RNA), zatvorte viečko a miešajte pulzným vortexom 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 alebo pomocou vhodnej pipety, napríklad viacstupňovej pipety Eppendorf alebo jej ekvivalentu.



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

4. Inkubujte pri teplote 56 °C (± 1 °C) po dobu 15 minút (± 1 min.).
5. Odstredujte lyzačnú skúmavku (LT) po dobu ≥ 5 sekúnd pri maximálnej rýchlosti na odstránenie kvapiek z vnútornej strany viečka.



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





7. Do lyzačnej skúmavky (LT) pridajte 600 µl etanolu (96 – 100 %), zatvorte viečko a dôkladne miešajte pulzným vortexom ≥ 15 sekúnd. Inkubujte 5 minút (± 1 minúta) pri izbovej teplote (15 – 25 °C).

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

9. Vložte stípec QIAamp MinElute do VacConnector (VC) na vákuovom systéme (pozri Obrázok 3, strana 24). Vložte nastavac stípca (EXT) do otvoreného stípca QIAamp MinElute.



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

10.  Vymeňte si rukavice a otvárajte vždy iba jednu skúmavku.
11. Celý lyzát z kroku 7 opatrne naneste do nastavca stĺpca (EXT) na stĺpci QIAamp MinElute bez navlhčenia okraja. Nedotýkajte sa membrány stĺpca QIAamp MinElute hrotom pipety.
12. Zapnite vákuové čerpadlo. Po pretiahnutí lyzátu cez stĺpec QIAamp MinElute otvorte ventil vákuového systému a uvoľnite vákuum.
- Ak spracovávate niekoľko stĺpcov QIAamp MinElute súčasne, odporúčame uzavrieť VacValve každého stĺpca po prechode lyzátu, aby sa skrátilo trvanie tohto kroku vákua.
-  Ak lyzát po 15 minútach úplne neprešiel membránou, zlikvidujte stĺpec QIAamp MinElute a zopakujte postup s novou vzorkou.
-  Na rýchle uvoľnenie tlaku vákua by sa mal použiť ventil vákuového systému.
13. Aplikujte 600 µl premývacieho pufru 1 (AW1) do stĺpca QIAamp MinElute. Opatrne odstráňte a zlikvidujte nastavce stĺpca (EXT) a zatvorte ventil vákuového systému. Po pretiahnutí premývacieho pufru 1 (AW1) cez stĺpec QIAamp MinElute otvorte ventil a uvoľnite vákuum.
-  Aby ste predišli krížovej kontaminácii, zabezpečte, aby odstránené nastavce stĺpca (EXT) neprechádzali ponad susedné stĺpce QIAamp MinElute.
14. Aplikujte 750 µl premývacieho pufru 2 (AW2) do stĺpca QIAamp MinElute bez navlhčenia okraja. Nedotýkajte sa membrány stĺpca QIAamp MinElute hrotom pipety. Viečko stĺpca nechajte otvorené a zatvorte ventil vákuového systému. Po pretiahnutí premývacieho pufru 2 (AW2) cez stĺpec QIAamp MinElute otvorte ventil a uvoľnite vákuum.

15. Aplikujte 750 µl etanolu (96 – 100 %) do stĺpca QIAamp MinElute bez navlhčenia okraja. Nedotýkajte sa membrány stĺpca QIAamp MinElute hrotom pipety. Viečko stĺpca nechajte otvorené a zatvorte ventil vákuového systému. Po pretiahnutí etanolu cez stĺpec QIAamp MinElute otvorte ventil a uvoľnite vákuum.



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

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



Vynechanie suchého odstredovania môže viesť k inhibícii následného testu.

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

18. Vložte stĺpec QIAamp MinElute do čistej elučnej skúmavky (ET) a premývaciu skúmavku (WT) zlikvidujte. Opatrne otvorte viečko stĺpca QIAamp MinElute a do stredu membrány aplikujte 20 µl alebo 60 µl elučného pufra (AVE) (v závislosti od následného testu). Zatvorte viečko a inkubujte pri izbovej teplote (15 – 25 °C) po dobu ≥3 minút. Odstredujte pri maximálnej rýchlosti (približne 20 000 x g alebo 14 000 otáčok za minútu) po dobu 1 minúty, aby sa eluovali vírusové nukleové kyseliny.



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

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite **www.qiagen.com** alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

História revízií

História úprav dokumentu

R3	Pridaná objasňujúca poznámka pod čiarou o kat. č. Vacuum Pump, pozri stranu 16.
08/2018	Aktualizované varovania a preventívne opatrenia. Aktualizovaný formát príručky.

Táto strana je zámerne prázdna

Táto strana je zámerne prázdna

Táto strana je zámerne prázdna

Obmedzená licenčná zmluva pre súpravu QIAamp DSP Virus Kit

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

1. Produkt sa môže používať výlučne v súlade s protokolmi poskytovanými spolu s produktom a touto príručkou, a môže sa používať výlučne s komponentmi obsiahnutými v súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeluje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tejto súpravy s akýmkoľvek komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy s výnimkou ustanovení uvádzaných v protokoloch dodávaných spolu s produktom, tejto príručke a 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 podrobne testované ani optimalizované spoločnosťou QIAGEN. Spoločnosť QIAGEN na ne neposkytuje žiadne záruky a neručí za to, že ich použitím nedôjde k porušeniu práv tretích strán.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že táto súprava a/alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava a jej 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 tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolia 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 so súpravou a/alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na adrese www.qiagen.com.

Ochranné známky: 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). 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.

1114514 08/2018 HB-0109-003 © 2018 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

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