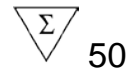


august 2018

Manualul kitului QIAamp[®] DSP Virus



Kitul QIAamp DSP Virus este un sistem generic, care utilizează tehnologia QIAamp pentru izolarea și purificarea acizilor nucleici virali din probele de plasmă sau ser uman, pentru proceduri de diagnosticare in vitro.

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro

IVD

CE

REF

60704

i

1114514RO



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

EC REP


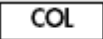







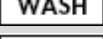

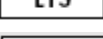

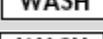



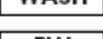



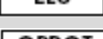

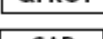

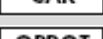




R3 **MAT**

1024585

Cuprins

Conținutul kitului.....	4
Simboluri	5
Depozitarea.....	6
Controlul calității.....	6
Domeniul de utilizare.....	6
Limitări în utilizarea produsului.....	7
Avertizări și precauții	7
Introducere	10
Principiu și procedură	13
Echipamente și reactivi care trebuie puși la dispoziție de utilizator	16
Note importante.....	17
Elemente importante înainte de începere	17
Prepararea ARN-ului.....	18
Depozitarea probelor	18
Prepararea reactivilor și a soluțiilor tampon	18
Eluarea acizilor nucleici virali	21
Randamentul și calitatea acizilor nucleici virali	22
Configurarea sistemului de vidare QIAvac 24 Plus	22
Protocol: Izolarea și purificarea acizilor nucleici virali din plasmă și ser	25
Istoricul revizuirilor	29

Conținutul kitului
























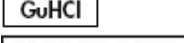


QIAamp DSP Virus Kit						
Nr. de catalog				60704		
Număr de preparări				50		
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Coloane QIAamp MinElute cu tuburi de spălare) (WT) (2 ml)			50		
EXT	Column Extenders (Prelungitoare pentru coloane) (3 ml)			50		
ET	Elution Tubes (Eprubete pentru eluție) (1,5 ml)			50		
VC	Conectori VacConnector			50		
LT	Lysis Tubes (Eprubete pentru liză) (2 ml)			50		
WT	Wash Tubes (Tuburi de spălare) (2 ml)			50		
AL	Lysis Buffer (Soluție tampon pentru liză)*			33 ml		
AW1	Wash Buffer 1 (concentrate) (Soluție tampon de spălare 1 (concentrat))*					19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (concentrate) (Soluție tampon de spălare 2 (concentrat))†					13 ml
AVE	Elution Buffer (purple caps) (Soluție tampon de eluție (capace mov))†					4 x 2 ml
PS	Protease Solvent (Solvent proteazic)†					4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (red caps) (ARN de transport (capace roșii))					310
QP	QIAGEN® Protease (QIAGEN® protează)					1 flacon
	CD					1
	Manual					1

* Conține clorhidrat de guanidină. Nu este compatibil cu dezinfectantele care conțin substanțe de albire. A se vedea pagina 7 pentru informații privind siguranța.

† Conține azidă de sodiu cu rol de conservant.

‡ Volum în resuspensie 4,4 ml.

Simboluri

	Kitul conține reactivi pentru 50 de preparări de probe
	Consultați informațiile din manual
	Destinat utilizării de către
	Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro
	Număr catalog
	Număr de lot
	Număr material
	Componente
	Volum
	Limitări de temperatură
	La sosire
	Producător legal
	Notă importantă
	Schimbați mănușile după etapa protocolului marcată cu acest simbol
	Deschideți la livrare; depozitați Coloanele QIAamp Mini Spin la 2–8 °C
	Număr de comercializare global articol
	Notați data curentă după adăugarea etanolului în flacon
	Adăugare
	Conține
	Liofilizat
	A se reconstitui în
	Etanol
	Clorhidrat de guanidină
	Acid maleic
	Subtilizină
	Duce la

Depozitarea

Coloanele QIAamp MinElute trebuie depozitate la 2–8 °C la sosire.

Toate soluțiile tampon pot fi depozitate la temperatura camerei (15–25 °C).

ARN-ul de transport liofilizat poate fi depozitat la temperatura camerei până la data de expirare. ARN-ul de transport poate fi dizolvat doar în soluție tampon de eluție (AVE); ARN-ul de transport dizolvat trebuie adăugat imediat în soluția tampon pentru liză (AL), conform descrierii de la pagina 18. Această soluție trebuie preparată în stare proaspătă și este stabilă la 2–8 °C timp de maximum 48 de ore. Părțile nefolosite de ARN de transport, dizolvate în soluție tampon de eluție (AVE), trebuie congelate în părți alicote la –20 °C.

QIAGEN protează (QP) liofilizată poate fi depozitată la temperatura camerei până la data de expirare, fără reducerea performanței.

QIAGEN protează (QP) reconstituită este stabilă pe o perioadă de maximum 1 an, dacă este depozitată la 2–8 °C, dar doar până la data de expirare.

Soluția tampon de spălare 1 (AW1) reconstituită și soluția tampon de spălare 2 (AW2) reconstituită sunt stabile pe o perioadă de maximum 1 an, dacă sunt depozitate la temperatura camerei, dar doar până la data de expirare.

Controlul calității

În conformitate cu sistemul total de management al calității certificat al QIAGEN, fiecare lot de kituri QIAamp DSP Virus este testat pentru specificațiile prestabilite, pentru a asigura calitatea constantă a produsului.

Domeniul de utilizare

Kitul QIAamp DSP Virus este un sistem generic, care utilizează tehnologia QIAamp pentru izolarea și purificarea acizilor nucleici virali din probele de plasmă sau ser uman, în scopul diagnosticării in vitro. Orice rezultate de diagnostic generate utilizând procedura de preparare a probelor, în asociere cu orice test NAT de diagnosticare din aval, trebuie interpretate în relație cu alte rezultate clinice sau de laborator.

Produsul este destinat utilizării de către utilizatori profesioniști, cum ar fi tehnicieni și medici instruiți în tehnicile de biologie moleculară. Acesta este conceput pentru a fi folosit cu orice aplicație din aval care utilizează amplificarea enzimatică sau altă modificare enzimatică a ADN-ului sau a ARN-ului, urmată de detectarea sau amplificarea semnalului. Acizii nucleici virali izolați și purificați pot fi folosiți atât în testele NAT de diagnosticare calitative (de exemplu, screening sanguin), precum și în testele cantitative (de exemplu, monitorizarea încărcării virale).

Pentru a reduce la minimum neregulile din rezultatele de diagnostic, produsul este destinat utilizării atât cu o substanță de control internă, cât și cu substanțe de control pozitive și negative pe toată durata procesului de preparare a probei și a procesului de amplificare și de detectare a probei, în funcție de testul din aval utilizat.

Produsul este conceput pentru utilizare cu sistemul de vidare QIAvac 24 Plus sau cu un sistem de vidare echivalent.

Limitări în utilizarea produsului

Kitul nu este destinat utilizării cu celulele sanguine, tisulare, ale măduvei osoase sau cu celule de cultură. De asemenea, kitul nu este destinat izolării și purificării acizilor nucleici bacterieni, fungici sau parazitari. Performanța kitului în izolarea și purificarea acizilor nucleici virali față de alte fluide corporale aceluare, precum urina și lichidul cefalorahidian (LCR), nu a fost evaluată.

Avertizări și precauții

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvați. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de securitate (safety data sheets, SDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online într-un format PDF ușor de utilizat și compact, la adresa www.qiagen.com/safety unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa cu date de securitate a fiecărui kit QIAGEN și a fiecărei componente a kitului.

ATENȚIE: Nu adăugați soluții de albire sau soluții acide în deșeurile rezultate din prepararea probelor.

Soluția tampon pentru liză (AL) și soluția tampon de spălare 1 (AW1) conțin clorhidrat de guanidină, care, în combinație cu soluțiile de albire, pot forma compuși cu reactivitate ridicată. Dacă lichidul care conține aceste soluții tampon se varsă, curățați cu un detergent adecvat pentru

laborator și cu apă. Dacă lichidul vărsat conține agenți potențial infecțioși, curățați mai întâi zona afectată cu detergent pentru laborator și cu apă, iar apoi cu hipoclorit de sodiu 1% vol.

Dacă flacoanele cu soluție tampon sunt deteriorate sau prezintă scurgeri, purtați mănuși și ochelari de protecție în timpul aruncării flacoanelor, pentru a evita vătămarea corporală proprie sau a altor persoane.

QIAGEN nu a testat deșeurile lichide generate prin procedura QIAamp DSP Virus pentru materiale reziduale infecțioase. Contaminarea deșeurilor lichide cu materiale reziduale infecțioase este extrem de puțin probabilă, dar nu poate fi exclusă în întregime. Prin urmare, deșeurile lichide trebuie considerate infecțioase și trebuie manipulate și aruncate în conformitate cu reglementările locale de siguranță.

Următoarele fraze de pericol și de precauție se aplică pentru componentele kitului QIAamp DSP Virus.

Soluție tampon AL



Conține: clorhidrat de guanidină; acid maleic. Avertisment! Poate fi nociv în caz de înghițire sau inhalare. Provoacă iritarea pielii. Provoacă o iritare gravă a ochilor. Poate provoca o reacție alergică a pielii. Dacă iritarea ochilor persistă: Consultați medicul. Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

Soluție tampon AW1



Conține: clorhidrat de guanidină. Avertisment! Nociv în caz de înghițire sau inhalare. Provoacă iritarea pielii. Provoacă o iritare gravă a ochilor. Sunați la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic, dacă nu vă simțiți bine. Aruncați conținutul/recipientul la o unitate autorizată de eliminare a deșeurilor. Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței.

QIAGEN protează



Conține: Subtilizină. Pericol! Provoacă iritarea ușoară a pielii. Provoacă leziuni oculare grave. Poate provoca simptome de alergie sau astm sau dificultăți de respirație în caz de inhalare. Evitați să inspirați praful/fumul/gazul/ceapa/vaporii/spray-ul. Aruncați conținutul/recipientul la o unitate autorizată de eliminare a deșeurilor. În caz de simptome respiratorii: Sunați la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu atenție cu apă, timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. ÎN CAZ DE INHALARE: Dacă respirația este dificilă, transportați victima la aer liber și mențineți-o în stare de repaus, într-o poziție confortabilă pentru respirație. Sunați la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau un medic. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție. Purtați echipament de protecție respiratorie.

Introducere

Kitul QIAamp DSP Virus utilizează o tehnologie consacrată pentru izolarea și purificarea simultană a ADN-ului și a ARN-ului viral. Procedura QIAamp DSP Virus combină proprietățile de legare selectivă ale unei membrane pe bază de silice cu volume de eluție minime de 20 μ l sau de 60 μ l.

Intervalul liniar al procedurii QIAamp DSP Virus a fost determinat pentru HIV ARN și HIV ADN în mai multe teste de diagnosticare din aval (Tabelul 1, Figura 1 și Figura 2).

Tabelul 1.-Teste de diagnosticare din aval, în care a fost testat intervalul liniar al procedurii QIAamp DSP Virus

Test	Kit
RT-PCR în timp real pentru HIV ARN	Testul TaqMan® și testul cobas® AMPLICOR HIV-1 MONITOR®
PCR în timp real pentru HIV ADN	Testul TaqMan și testul cobas AMPLICOR HBV MONITOR®

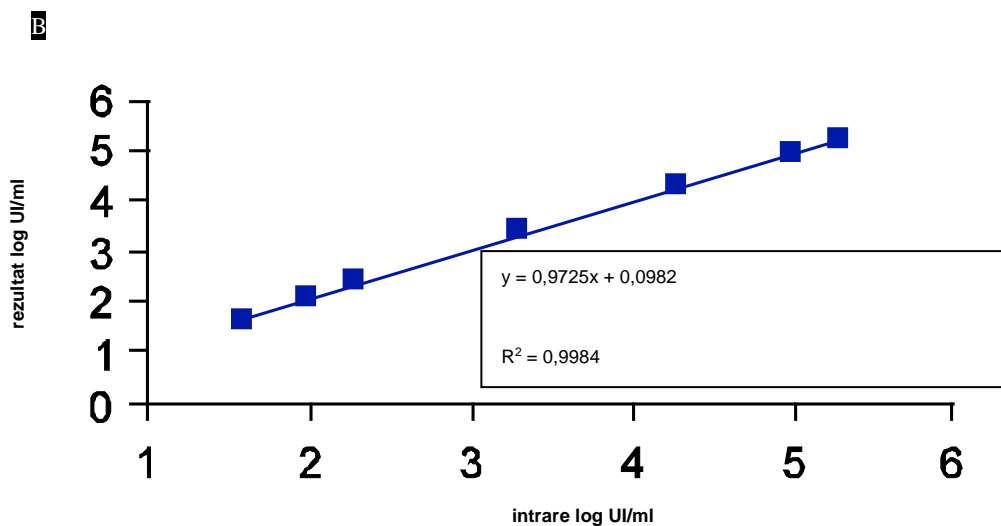
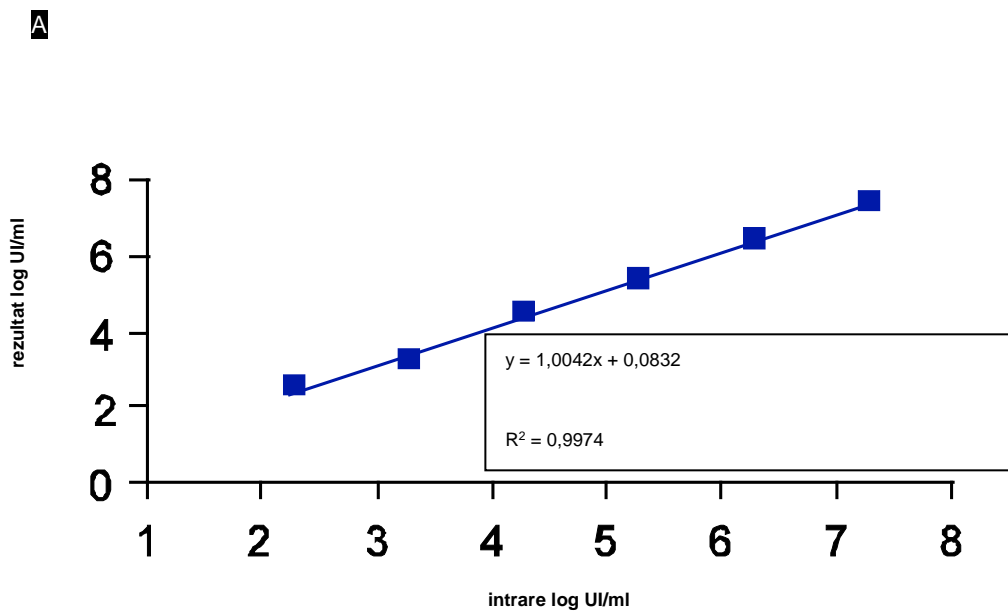


Figura 1. Intervalul liniar al procedurii QIAamp DSP Virus utilizând testele TaqMan. Intervalul liniar al procedurii QIAamp DSP Virus la un volum de eluție de 60 μ l a fost determinat folosind testele TaqMan pentru **A** HIV ARN și **B** HBV ADN.

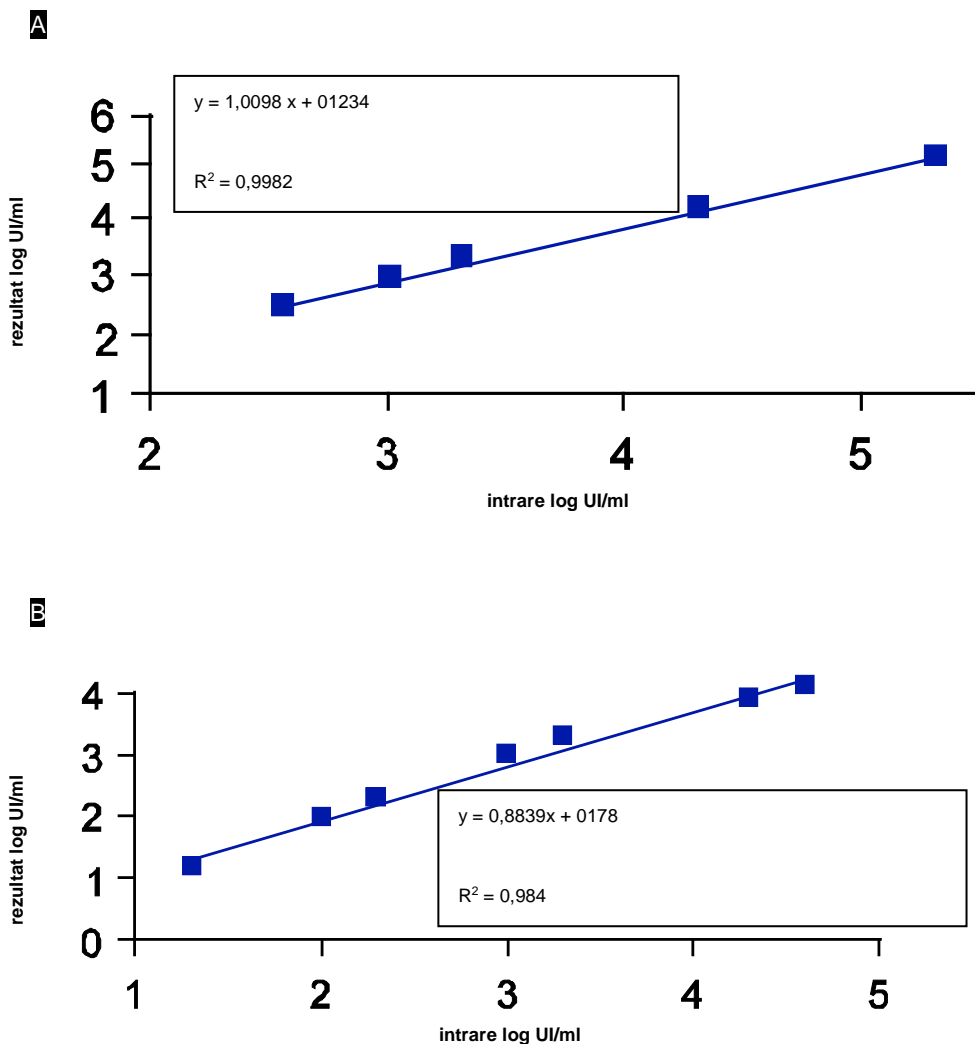


Figura 2. Intervalul liniar al procedurii QIAamp DSP Virus utilizând testele cobas AMPLICOR MONITOR. Intervalul liniar al procedurii QIAamp DSP Virus la un volum de eluție de 60 μ l a fost determinat folosind testele cobas AMPLICOR MONITOR pentru **A** HIV ARN și **B** HBV ADN.

Procedura este adecvată pentru utilizare cu plasma sau cu serul; oricare dintre acestea poate conține citrat sau EDTA. Probele pot fi proaspete, liofilizate sau congelate, cu condiția să fi fost congelate și decongelate o singură dată. Procedura poate fi utilizată pentru izolarea ARN-ului și a ADN-ului viral dintr-o varietate largă de virusuri ARN și ADN. Procedura este concepută pentru a evita contaminarea încrucișată între probe și pentru a permite manipularea sigură a probelor potențial infecțioase. Procedura este extrem de adecvată pentru procesarea simultană a mai multor probe. Acizii nucleici virali sunt eluați în soluție tampon de eluție (AVE), pregătiți pentru utilizare în reacții de amplificare sau pentru depozitare la -20 °C.

Principiu și procedură

Procedura QIAamp DSP Virus este formată din 4 etape:

- Lizarea particulelor de virus în probă
- Legarea acizilor nucleici virali din lizat cu membrana unei coloane QIAamp MinElute
- Spălarea membranei
- Eluarea acizilor nucleici virali din membrană

Procedura este realizată utilizând coloane QIAamp MinElute pe un colector de vidare.

Volumul probei

Limita de detecție (detection limit, DL) și limita de cuantificare (quantification limit, QL), în conformitate cu recomandările ICH 2QA și 2QB, au fost determinate pentru procedura QIAamp DSP Virus (cu un volum inițial al probei de 500 µl și cu volume de eluție de 20 µl și de 60 µl), utilizând diverse teste de diagnosticare din aval (Tabelul 2 și Tabelul 3).

Tabelul 2.-Limita de detecție a procedurii QIAamp DSP Virus

Test	Volum de eluție	Prag de 95%
artus [®] RealArt™ HBV ADN	20 µl	2,31 UI/ml (n = 240)
artus RealArt HCV ARN	20 µl	24,31 UI/ml (n = 192)
AMPLICOR manual HIV ARN	60 µl	90,92 UI/ml (n = 209)
TaqMan HBV ADN	60 µl	4,73 UI/ml (n = 192)

Tabelul 3.-Limita de cuantificare a procedurii QIAamp DSP Virus

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

Lizarea particulelor de virus

Probele sunt lizate în condiții de denaturare la temperaturi ridicate. Liza este realizată în prezența QIAGEN protează (QP) și a soluției tampon pentru liză (AL), care asigură împreună neutralizarea RN-azelor.

Legarea acizilor nucleici de membrana coloanei QIAamp MinElute

Pentru a optimiza legarea ADN-ului și a ARN-ului viral de membrana coloanei QIAamp MinElute, etanolul este primul adăugat în lizate. Ulterior, fiecare lizat este aplicat unei coloane QIAamp MinElute și acizii nucleici virali sunt adsorbiți pe membrana de silicagel, în timp ce lizatul este extras prin presiunea vidului.

Eliminarea agenților de contaminare reziduali

În timp ce acizii nucleici virali rămân legați de membrana coloanei QIAamp MinElute, agenții de contaminare sunt îndepărtați prin spălare în mod eficient, utilizând mai întâi soluția tampon de spălare 1 (AW1), apoi soluția tampon de spălare 2 (AW2), apoi etanolul.

Eluarea acizilor nucleici puri

Acizii nucleici virali sunt eluați din membrana coloanei QIAamp MinElute, utilizând soluție tampon de eluție (AVE). Coloanele QIAamp MinElute permit volume de eluție de 20 µl sau de 60 µl.

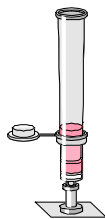
În funcție de testul din aval utilizat, eluatul acidului nucleic poate conține până la 50% din volumul de reacție, fără niciun fel de efect de inhibare.

Procedura QIAamp DSP Virus

Probă

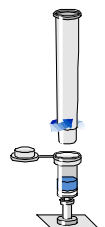


Liză



Realizați legarea

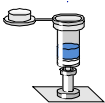
Vidați



Spălați (AW1)

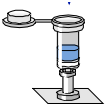
Îndepărtați prelungitoarele înainte de aplicarea vidului

Vidați



Spălați (AW2)

Vidați



Spălați (Etanol)

Vidați



Centrifugați în atmosferă uscată

Eluați



Acid nucleic viral

Citiți cu atenție protocolul (pagina 25) înainte de a începe

Adăugați 75 μ l QP, 500 μ l probă și 500 μ l AL în LT

Vortexați 15 s

Incubați 15 min (\pm 1 min) la 56 °C (\pm 1 °C)

Adăugați 600 μ l etanol

Vortexați 15 s

Incubați 5 min (\pm 1 min) la temperatura camerei (15 – 25 °C)

Transferați lizatul în coloana QIAamp MinElute cu prelungitoarele atașate

Adăugați 600 μ l de AW1 reconstituită

Îndepărtați prelungitoarele

Adăugați 700 μ l de AW2 reconstituită

Adăugați 750 μ l etanol

Amplasați coloana QIAamp MinElute în WT

Centrifugați 1 min la 14.000 rot/min

Amplasați coloana QIAamp MinElute în WT

Incubați 3 min la 56 °C

Amplasați coloana QIAamp MinElute în ET

Adăugați 20 μ l sau 60 μ l de AVE

Incubați 3 min la temperatura camerei

Centrifugați 1 min la 14.000 rot/min

Echipamente și reactivi care trebuie puși la dispoziție de utilizator

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvați. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de securitate (SDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

- Etanol (96–100%)
- Pipete* și vârfuri de pipete (pentru a preveni contaminarea încrucișată, recomandăm cu fermitate utilizarea vârfurilor de pipete cu bariere de aerosoli)
- Mănuși de unică folosință
- Bloc termic* pentru lizarea probelor la 56 °C (recomandăm Eppendorf® Thermomixer confort cu termobloc pentru microeprubete de testare de 2,0 ml†)
- Microcentrifugă*
- Cilindru de măsurare (50 ml)
- Agitator vortex
- Sistem de vidare QIAvac 24 Plus‡ (QIAvac 24 Plus, cat. nr. 19413, sistem de conectare QIAvac, cat. nr. 19419 și pompă de vidare, cat. nr. 84020§) sau un sistem de vidare de laborator universal echivalent

* Pentru a vă asigura că probele sunt procesate în mod corespunzător în timpul procedurii QIAamp DSP Virus, recomandăm cu fermitate ca instrumentele (de exemplu, pipetele și blocurile termice) să fie calibrate în conformitate cu recomandările producătorilor.


† Aceasta nu este o listă completă a furnizorilor și nu include numeroși comercianți importanți de consumabile biologice.

‡ Disponibil de la jumătatea anului 2004; consultați www.qiagen.com/products/accessories.

§ Cat. nr. 84020 se referă la o pompă adecvată pentru țările europene (de exemplu, Germania). Pentru țările cu cerințe diferite pentru tensiune sau ștechere, contactați Serviciul Tehnic QIAGEN.

Note importante

Elemente importante înainte de începere

- După primirea kitului, verificați componentele acestuia pentru semne de deteriorare. Dacă ambalajele de tip blister sau flacoanele cu soluție tampon sunt deteriorate, contactați Serviciile Tehnice QIAGEN sau distribuitorul local. În cazul scurgerilor de lichide, consultați „Avertizări și precauții” (pagina 7).
- Nu utilizați componente deteriorate ale kitului, deoarece utilizarea acestora poate duce la o performanță slabă a kitului.
- Utilizați întotdeauna echipamente fără RN-ază.
- Depozitați etanolul (96 – 100%) în gheață în timpul procedurii.
- Înlocuiți întotdeauna vârful pipetelor între transferurile de lichide. Pentru a evita contaminarea încrucișată, recomandăm utilizarea vârfulor pentru pipete cu barieră de aerosoli.
- Toate etapele de centrifugare sunt realizate la temperatura camerei (15–25 °C).
- Utilizați întotdeauna mănuși de unică folosință și verificați cu regularitate dacă acestea sunt contaminate cu materialul probei.
- Aruncați mănușile dacă acestea sunt contaminate și cel puțin în toate etapele marcate cu simbolul mănușă. 
- Pentru a evita contaminarea încrucișată, deschideți câte o eprubetă pe rând.
- Nu utilizați componente de la alte kituri împreună cu kitul utilizat momentan, dacă numerele loturilor nu sunt identice.
- Evitați contaminarea microbiană a reactivilor kitului.
- Pentru a garanta siguranța împotriva materialelor potențial infecțioase, recomandăm lucrul în condiții de curgere laminară a aerului, până la lizarea probelor.
- Acest kit trebuie utilizat doar de personalul instruit în practica de laborator pentru diagnosticare in vitro.
- Procedura oferă instrucțiuni pentru procesarea unei singure probe de plasmă sau de ser. Cu toate acestea, pe sistemul de vidare QIAvac 24 Plus pot fi procesate simultan până la 24 de probe.

Prepararea ARN-ului

În timpul preparării ARN-ului viral, lucrați rapid în timpul etapelor manuale ale procedurii.

Soluția tampon de eluție (AVE) conține azidă de sodiu*, un agent antimicrobian care previne dezvoltarea organismelor care produc RN-ază. Cu toate acestea, deoarece soluția tampon nu conține substanțe chimice de degradare a RN-azelor, aceasta nu va inhiba activ RN-azele generate din cauza unei manipulări necorespunzătoare. Manifestați o atenție deosebită pentru a evita contaminarea cu RN-aze în timpul manipulării soluției tampon de eluție (AVE).

Depozitarea probelor

După recoltare și centrifugare, plasma sau serul pot fi depozitate la 2–8 °C timp de maximum 6 ore. Pentru depozitarea pe termen lung, se recomandă congelarea la –20 °C sau la –80 °C în părți alicote. Probele de plasmă sau de ser congelate nu trebuie decongelate de mai multe ori. Ciclurile repetate de congelare–decongelare conduc la denaturarea și precipitarea proteinelor, având ca rezultat titre virale reduse și, prin urmare, randamente reduse ale acizilor nucleici virali. În plus, crioprecipitatele formate în timpul ciclului de congelare–decongelare vor colmata membrana coloanei QIAamp MinElute. În cazul în care crioprecipitatele sunt vizibile, acestea trebuie aglomerate prin centrifugare la aproximativ 6800 x *g* timp de 3 minute. Lichidul supernatant limpezit trebuie aspirat și procesat imediat, fără tulburarea peletului.

Prepararea reactivilor și a soluțiilor tampon

Prepararea QIAGEN protează

Adăugați întregul conținut al flaconului care conține 4,4 ml de solvent proteazic (PS) în flaconul cu QIAGEN protează (QP) liofilizată și amestecați cu atenție. Pentru a evita formarea de spumă, amestecați prin răsturnarea flaconului de mai multe ori. Asigurați-vă că QIAGEN protează (QP) s-a dizolvat complet.



Nu adăugați QIAGEN protează (QP) direct în soluția tampon pentru liză (AL).

* Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvați.

Adăugarea ARN-ului de transport și a substanței de control interne în soluția tampon pentru liză

ARN-ul de transport deservește două scopuri. În primul rând, îmbunătățește legarea acizilor nucleici virali de membrana coloanei QIAamp MinElute, în special dacă în probă există foarte puține molecule țintă. În al doilea rând, adăugarea unor cantități mari de ARN de transport reduce posibilitatea degradării ARN-ului viral în cazurile rare în care moleculele de RN-ază nu sunt denaturate de sărurile caotropice și de detergentul din soluția tampon pentru liză (AL). Dacă ARN-ul de transport nu este adăugat în soluția tampon pentru liză (AL), acest lucru poate duce la o recuperare redusă a ARN-ului sau a ADN-ului viral.

De asemenea, ARN-ul de transport poate fi inclus în unii reactivi ai substanțelor de control interne din testele din aval comerciale. În aceste cazuri, consultați instrucțiunile de utilizare relevante puse la dispoziție de producătorul testului din aval.

Utilizarea unei substanțe de control interne este recomandată cu fermitate în timpul utilizării kitului QIAamp DSP Virus în asociere cu sisteme de amplificare pentru diagnosticare. ARN-ul sau ADN-ul cu substanță de control internă și ARN-ul de transport reconstituit trebuie adăugate în soluția tampon pentru liză (AL) și amestecate bine, prin răsturnarea eprubetei de 10 ori. Pentru a evita formarea de spumă, nu vortexați.

Pentru a determina concentrația optimă de substanță de control internă, consultați instrucțiunile producătorului. Utilizarea unei concentrații diferite de cea recomandată poate duce la rezultate incorecte. Atunci când se calculează cantitatea corectă de substanță de control internă care trebuie utilizată, luați în considerare volumul inițial al probei și volumul de eluție. Rețineți: kitul QIAamp DSP Virus utilizează un volum inițial al probei de 500 μ l.

Pentru a prepara soluția de ARN de transport, adăugați 310 μ l de soluție tampon de eluție (AVE) în eprubeta care conține 310 μ g de ARN de transport liofilizat, pentru a obține o soluție de 1 μ g/ μ l. Dizolvați bine ARN-ul de transport, împărțiți-l în părți alicote dimensionate în mod convenabil și depozitați la -20 °C. Nu congelați–decongelați părțile alicote de ARN de transport mai mult de 2 ori.

Rețineți că ARN-ul de transport nu se dizolvă în soluția tampon pentru liză (AL). Acesta trebuie dizolvat mai întâi în soluție tampon de eluție (AVE), apoi adăugat în soluția tampon pentru liză (AL). Asigurați-vă că ARN-ul de transport este complet dizolvat în volumul corect de soluție tampon de eluție (AVE) înainte de amestecarea acestuia cu soluția tampon pentru liză (AL).



Utilizați întotdeauna substanța de control internă corectă pentru testul din aval. Consultați instrucțiunile producătorului pentru informații suplimentare.

Calculați volumul amestecului de soluție tampon pentru liză (AL)/ARN de transport, necesar pentru fiecare lot de probe, prin selectarea numărului de probe care trebuie procesate simultan din Tabelul 4. Volumele sunt calculate utilizând următorul calcul al probei:

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

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

unde: n = numărul de probe care trebuie procesate simultan

y = volumul calculat al soluției tampon pentru liză (AL)

z = volumul ARN-ului de transport/soluției tampon de eluție (AVE) care trebuie adăugat în soluția tampon pentru liză (AL)

Tabelul 4.-Volumele de soluție tampon pentru liză (AL) și ARN de transport/soluție tampon de eluție (AVE) necesare pentru procedura QIAamp DSP Virus

Nr. de probe	Vol. AL (ml)	Vol. ARN de transport/AVE (μl)	Nr. de probe	Vol. AL (ml)	Vol. ARN de transport/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

Prepararea soluției tampon de spălare 1

Utilizând un cilindru de măsurare, adăugați 25 ml de etanol (96–100%) în flaconul care conține 19 ml de soluție tampon de spălare 1 (AW1) concentrat. Depozitați soluția tampon de spălare 1 (AW1) reconstituită la temperatura camerei (15–25 °C).



Amestecați întotdeauna soluția tampon de spălare 1 (AW1) reconstituită prin răsturnarea flaconului de mai multe ori înainte de a începe procedura.

Prepararea soluției tampon de spălare 2

Utilizând un cilindru de măsurare, adăugați 30 ml de etanol (96–100%) în flaconul care conține 13 ml de soluție tampon de spălare 2 (AW2) concentrat. Depozitați soluția tampon de spălare 2 (AW2) reconstituită la temperatura camerei (15–25 °C).



Amestecați întotdeauna soluția tampon de spălare 2 (AW2) reconstituită prin răsturnarea flaconului de mai multe ori înainte de a începe procedura.

Prepararea soluției tampon de eluție

Împreună cu kitul sunt furnizate patru eprubete de soluție tampon de eluție (AVE). Aveți grijă să nu contaminați soluția tampon cu RN-aze. Dacă efectuați maximum 4 proceduri de purificare utilizând un singur kit, recomandăm aruncarea eprubetei de soluție tampon de eluție (AVE) la finalul fiecărei proceduri.

Eluarea acizilor nucleici virali

Pentru aplicațiile din aval care necesită volume inițiale mici (de exemplu, unele teste PCR și RT-PCR), utilizarea acizilor nucleici virali eluați în 20 μl de soluție tampon de eluție (AVE) poate crește sensibilitatea testului.

Volumul de acizi nucleici virali eluați dintr-o coloană QIAamp MinElute poate fi cu până la 5 μl mai mic decât volumul soluției tampon de eluție (AVE) aplicat coloanei. De exemplu, eluarea acizilor nucleici virali cu 60 μl de soluție tampon de eluție (AVE) duce la un eluat de aproximativ 55 μl, în timp ce eluarea cu 20 μl are ca rezultat aproximativ 15 μl de eluat.

Volumul de eluat recuperat depinde de natura probei. Dacă volumul de eluat recuperat este prea mic pentru testul din aval, măriți volumul prin adăugarea unei cantități mai mari de soluție tampon de eluție (AVE).

Acizii nucleici virali eluați sunt recoltați în eprubete pentru eluție (ET). Dacă depozitați acizii nucleici virali timp de până la 24 de ore, recomandăm depozitarea la 2–8 °C.

Randamentul și calitatea acizilor nucleici virali

Randamentul și calitatea acizilor nucleici virali izolați sunt adecvate pentru toate tipurile de proceduri de detectare din aval în diagnosticare moleculară. Testele de diagnosticare trebuie efectuate în conformitate cu instrucțiunile producătorilor.

Configurarea sistemului de vidare QIAvac 24 Plus

Asigurați-vă că ați configurat prelungitorul pentru coloane (EXT), coloana QIAamp MinElute, conectorul VacConnector (VC) și supapa VacValve în mod corect (consultați Figura 3).

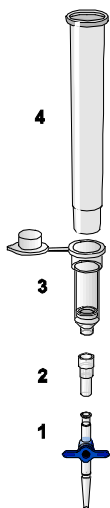


Figura 3. Asamblarea componentelor kitului QIAamp DSP Virus pentru procesarea în vid a probelor:

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1: Supapă VacValve (furnizată împreună cu sistemul de vidare) | 3: Coloană QIAamp MinElute |
| 2: Conector VacConnector (VC) | 4: Prelungitor pentru coloane (EXT) |

Recomandăm etichetarea eprubetelor pentru liză (LT), a eprubetelor pentru eluție (ET) și a coloanelor QIAamp MinElute pentru utilizare pe sistemul de vidare QIAvac 24 Plus în conformitate cu schema din Figura 4 pentru a se evita încurcarea probelor. Această imagine poate fi fotocopiată și etichetată cu numele probelor.

Data: _____

Operator: _____

ID execuție: _____

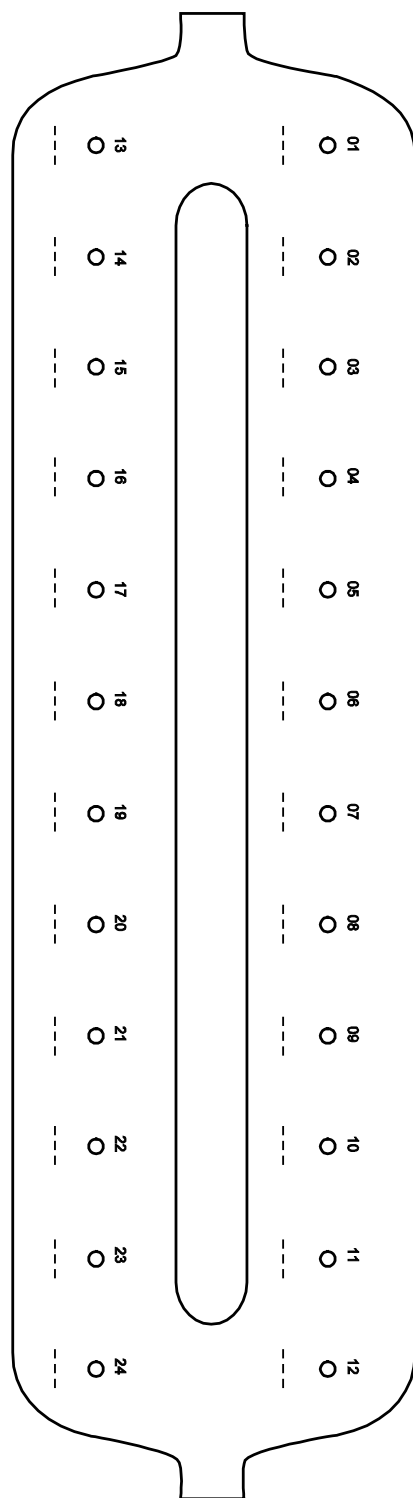


Figura 4. Schemă de etichetare pentru eprubetele pentru liză (LT), eprubetele pentru eluție (ET) și coloanele QIAamp MinElute pentru utilizare pe sistemul de vidare QIAvac 24 Plus.

Protocol: Izolarea și purificarea acizilor nucleici virali din plasmă și ser

Pentru izolarea și purificarea acizilor nucleici virali din 500 µl de plasmă și ser tratate cu EDTA sau cu citrat.

Operațiuni care trebuie executate înainte de începere

- Acclimatizați probele la temperatura camerei (15–25 °C), și asigurați-vă că acestea sunt bine amestecate.
- Adăugați ARN de transport reconstituit în soluție tampon de eluție (AVE) sau substanță de control internă în soluție tampon pentru liză (AL), în conformitate cu instrucțiunile de la pagina 18.
- Asigurați-vă că soluția tampon de spălare 1 (AW1), soluția tampon de spălare 2 (AW2) și QIAGEN protează (QP) au fost preparate în conformitate cu instrucțiunile din „Note importante” de la pagina 17.
- Acclimatizați soluția tampon de eluție (AVE) la temperatura camerei (15–25 °C) pentru utilizare în etapa 18. Dacă este posibil, utilizați soluție tampon de eluție (AVE) proaspătă pentru fiecare procedură (sunt furnizate 4 eprubete).
- Setati un bloc termic la 56 °C pentru utilizare în etapele 4 și 17.
- Pentru a evita contaminarea încrucișată, introduceți un conector VacConnector (VC) în fiecare adaptor Luer al sistemului de vidare.
- Asigurați-vă că flaconul de deșeurii al sistemului de vidare este gol și că toate cuplajele sunt conectate corect.
- Pentru detalii cu privire la funcționarea sistemului de vidare, în special cu privire la întreținere, consultați manualul furnizat împreună cu acesta.

Procedură

1. Pipetați 75 µl de QIAGEN protează (QP) într-o eprubetă pentru liză (LT).



Verificați data de expirare a proteazei reconstituite înainte de utilizare.

2. Adăugați 500 µl de plasmă sau de ser în eprubeta pentru liză (LT).

3. Adăugați 500 µl de soluție tampon pentru liză (AL) (care conține 11,2 µg/ml de ARN de transport) în eprubeta pentru liză (LT), închideți capacul și amestecați prin vortexare cu impulsuri timp de 15 secunde.


Pentru a asigura o liză eficientă, este esențial ca proba și soluția tampon pentru liză (AL) să fie amestecate bine pentru a se obține o soluție omogenă.



Soluția tampon pentru liză (AL) conține substanță de control internă. Deoarece soluția tampon pentru liză (AL) are o viscozitate ridicată, asigurați-vă că adăugați volumul corect de soluție tampon pentru liză (AL) prin pipetarea atentă sau prin utilizarea unei pipete adecvate, cum ar fi o pipetă Eppendorf cu mai multe trepte sau o pipetă echivalentă.



Nu adăugați QIAGEN protează (QP) direct în soluția tampon pentru liză (AL).

4. Incubați la 56 °C (± 1 °C) timp de 15 minute (± 1 min).
5. Centrifugați eprubeta pentru liză (LT) timp de ≥ 5 secunde la viteză maximă pentru a elimina picăturile din interiorul capacului.
6.  Schimbați mănușile și deschideți cu atenție eprubeta pentru liză (LT).
7. Adăugați 600 µl de etanol (96–100%) în eprubeta pentru liză (LT), închideți capacul și amestecați bine prin vortexare cu impulsuri timp de ≥ 15 secunde. Incubați timp de 5 minute (± 1 minut) la temperatura camerei (15–25 °C).
8. Centrifugați eprubeta pentru liză (LT) timp de ≥ 5 secunde la viteză maximă pentru a elimina picăturile din interiorul capacului.
9. Introduceți coloana QIAamp MinElute în conectorul VacConnector (VC) în sistemul de vidare (consultați Figura 3, pagina 22). Introduceți un prelungitor pentru coloane (EXT) în coloana QIAamp MinElute deschisă.



Păstrați eprubeta de spălare (WT) pentru centrifugarea în atmosferă uscată din etapa 16.



10. Schimbați mănușile și deschideți câte o eprubetă pe rând.
11. Aplicați cu atenție întregul lizat din etapa 7 în prelungitorul pentru coloane (EXT) al coloanei QIAamp MinElute fără a umezi marginea. Evitați atingerea membranei coloanei QIAamp MinElute cu vârful pipetei.
12. Porniți pompa de vidare. După ce lizatul a fost extras prin coloana QIAamp MinElute, deschideți supapa sistemului de vidare și eliberați presiunea vidului.

Dacă procesați mai multe coloane QIAamp MinElute simultan, recomandăm închiderea supapei VacValve a fiecărei coloane, după ce lizatul a trecut, pentru a reduce durata acestei etape de vidare.



Dacă lizatul nu a trecut complet prin membrană după 15 minute, aruncați coloana QIAamp MinElute și repetați procedura cu o probă nouă.



Supapa sistemului de vidare trebuie utilizată pentru eliberarea rapidă a presiunii vidului.

13. Aplicați 600 µl de soluție tampon de spălare 1 (AW1) în coloana QIAamp MinElute.

Îndepărtați cu atenție și aruncați prelungitorul pentru coloane (EXT) și închideți supapa sistemului de vidare. După ce soluția tampon de spălare 1 (AW1) a fost extrasă prin coloana QIAamp MinElute, deschideți supapa și eliberați presiunea vidului.



Pentru a evita contaminarea încrucișată, asigurați-vă că prelungitoarele pentru coloane (EXT) îndepărtate nu trec pe deasupra coloanelor QIAamp MinElute învecinate.

14. Aplicați 750 µl de soluție tampon de spălare 2 (AW2) în coloana QIAamp MinElute, fără a umezi marginea. Evitați atingerea membranei coloanei QIAamp MinElute cu vârful pipetei. Lăsați deschis capacul coloanei și închideți supapa sistemului de vidare. După ce soluția tampon de spălare 2 (AW2) a fost extrasă prin coloana QIAamp MinElute, deschideți supapa și eliberați presiunea vidului.

15. Aplicați 750 µl de etanol (96–100%) în coloana QIAamp MinElute, fără a umezi marginea. Evitați atingerea membranei coloanei QIAamp MinElute cu vârful pipetei. Lăsați deschis capacul coloanei și închideți supapa sistemului de vidare. După ce etanolul a fost extras prin coloana QIAamp MinElute, deschideți supapa și eliberați presiunea vidului.



Utilizați vârfuri de pipete cu barieră de aerosoli pentru a aplica etanol în coloana QIAamp MinElute.

16. Închideți capacul coloanei QIAamp MinElute, îndepărtați-l din sistemul de vidare și aruncați conectorul VacConnector (VC). Amplasați coloana QIAamp MinElute în eprubeta de spălare (WT) păstrată din etapa 9 și centrifugați la viteză maximă (aproximativ 20.000 x g sau 14.000 rot/min) timp de 1 minut pentru uscarea completă a membranei. Aruncați eprubeta de spălare (WT) care conține filtratul.



Omiterea etapei de centrifugare în atmosferă uscată poate duce la inhibarea testului din aval.

17. Amplasați coloana QIAamp MinElute într-o eprubetă de spălare (WT) nouă și incubați cu capacul deschis la 56 °C timp de 3 minute pentru evaporarea posibilelor resturi de lichid.

18. Amplasați coloana QIAamp MinElute într-o eprubetă pentru eluție (ET) curată și aruncați eprubeta de spălare (WT). Deschideți cu atenție capacul coloanei QIAamp MinElute și aplicați 20 µl sau 60 µl de soluție tampon de eluție (AVE) (în funcție de testul din aval) în centrul membranei. Închideți capacul și incubați la temperatura camerei (15–25 °C) timp de ≥3 minute. Centrifugați la viteză maximă (aproximativ 20.000 x g sau 14.000 rot/min) timp de 1 minut pentru eluarea acizilor nucleici virali.



Urmați procedura de întreținere pentru sistemul de vidare, după realizarea acestui protocol (pentru mai multe detalii, consultați manualul furnizat împreună cu sistemul de vidare).

Pentru informații actualizate privind licențele și clauzele de declinare a răspunderii specifice produselor, consultați ghidul sau manualul de utilizare al kit-ului QIAGEN respectiv. Ghidurile și manualele de utilizare ale kiturilor QIAGEN sunt disponibile la adresa www.qiagen.com sau pot fi solicitate de la Serviciile Tehnice QIAGEN sau distribuitorul local.

Istoricul revizuirilor

Istoricul revizuirilor documentului	
R4 08/2018	Adăugarea notei de subsol de clarificare cu privire la cat. nr. al pompei de vidare, consultați pagina 16. Format actualizat al manualului.

Acord de licență limitată pentru XXXXX [introduceți numele produsului]

Utilizarea acestui produs înseamnă acceptarea următorilor termeni de către orice cumpărător sau utilizator al produsului:

1. Produsul poate fi utilizat doar în conformitate cu protocoalele furnizate împreună cu produsul și prezentul manual și doar împreună cu componentele incluse în trusă. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în acest kit cu orice componentă care nu este inclusă în acest kit, dacă nu este precizat astfel în protocoalele furnizate împreună cu produsul, în prezentul manual și în protocoalele suplimentare disponibile la adresa www.qiagen.com. Unele dintre aceste protocoale suplimentare au fost furnizate de utilizatorii QIAGEN pentru utilizatorii QIAGEN. Aceste protocoale nu au fost testate riguros sau optimizate de QIAGEN. QIAGEN nu le garantează și nici nu asigură faptul că acestea nu încalcă drepturile terților.
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că această trusă și/sau utilizarea (utilizările) acesteia nu încalcă drepturile terților.
3. Această trusă și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute.
4. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul trusei acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre acțiunile interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de trusă și/sau componentele acesteia.

Pentru termenii actualizați ai licenței, consultați www.qiagen.com.

Mărci comerciale: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, MinElute® (Grupul QIAGEN); AMPLICOR HBV MONITOR®, AMPLICOR HCV MONITOR®, AMPLICOR HIV-1 MONITOR®, cobas®, TaqMan® (Grupul Roche); RealArt™ (artus GmbH); Eppendorf® (Eppendorf AG). Denumirile înregistrate, mărcile comerciale etc. utilizate în documentul de față, chiar dacă nu sunt marcate în mod specific, sunt protejate prin lege.

Procesul PCR este acoperit de brevetele americane 4.683.195 și 4.683.202 și de echivalentele străine deținute de Hoffmann-La Roche AG.

1114514 08/2018 HB-0109-003 © 2018 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

Pentru comenzi www.qiagen.com/shop | Suport tehnic support.qiagen.com | Site web www.qiagen.com