

Istruzioni per l'uso (manuale) del QIAamp[®] DSP Virus Kit



Versione 2

IVD

Per uso diagnostico in vitro

Per l'uso con QIAamp[®] DSP Virus Kit

CE

REF

60704



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R1 **MAT**

1127541IT

Indice

Uso previsto	4
Utente previsto	4
Descrizione e principio	5
Lisi con QIAGEN Protease (QP)	5
Assorbimento nella membrana QIAamp MinElute.....	5
Rimozione dei residui contaminanti	6
Eluizione di acidi nucleici di virali	6
Resa e qualità degli acidi nucleici virali	7
Aggiunta di controlli interni	8
Sommario e spiegazioni	10
Materiali in dotazione.....	11
Contenuto del kit.....	11
Componenti del kit	12
Materiali necessari ma non in dotazione	13
Reagenti aggiuntivi.....	13
Materiali di consumo	13
Strumentazione	13
Avvertenze e precauzioni	14
Informazioni sulla sicurezza.....	14
Informazioni di emergenza.....	15
Precauzioni	16
Smaltimento.....	17

Conservazione e manipolazione dei reagenti	18
Stabilità durante l'uso	18
Raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni.....	20
Note importanti	22
Punti importanti prima di iniziare	22
Manipolazione delle QIAamp MinElute Column.....	23
Preparazione di reagenti e tamponi	23
Impostazione dell'apparato da vuoto QIAvac 24 Plus	28
Protocollo: isolamento e purificazione degli acidi nucleici virali da plasma e siero	30
Controllo di qualità	35
Limitazioni	36
Caratteristiche delle prestazioni.....	37
Guida alla risoluzione dei problemi.....	38
Simboli.....	43
Appendice.....	46
Informazioni per gli ordini	47
Cronologia delle revisioni del documento	48

Uso previsto

Il QIAamp® DSP Virus Kit è destinato all'isolamento e alla purificazione manuali di acidi nucleici virali di campioni di plasma o siero umani.

Il QIAamp DSP Virus Kit utilizza la tecnologia su membrana di silice (tecnologia QIAamp) per l'isolamento e la purificazione di acidi nucleici virali di campioni di plasma o siero umani.

Questo prodotto è destinato all'uso diagnostico in vitro ed è rivolto a utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti in tecniche di biologia molecolare.

Utente previsto

Il prodotto è concepito per l'uso da parte di personale professionista, come tecnici e medici esperti nelle tecniche di biologia molecolare.

Descrizione e principio

La procedura QIAamp DSP Virus prevede 4 fasi (lisi, legame, lavaggio ed eluizione) e viene eseguita con le QIAamp MinElute® Column insieme a un collettore per il vuoto e a una microcentrifuga standard. La procedura è studiata per minimizzare il potenziale di contaminazione crociata tra campioni e permette di manipolare con sicurezza i campioni potenzialmente infettivi. La semplice procedura QIAamp DSP Virus indicata per processare simultaneamente più campioni. Il QIAamp DSP Virus Kit può essere usato per isolare l'RNA e il DNA virali da un'ampia gamma di virus a RNA e DNA. Tuttavia non sono state accertate le caratteristiche delle prestazioni per ogni specie virale, pertanto l'utente le deve convalidare.

Lisi con QIAGEN Protease (QP)

I campioni vengono lisati in condizioni denaturanti a temperature elevate. La lisi viene eseguita in presenza di QIAGEN Protease (QP) e di tampone di lisi (AL), che insieme assicurano l'inattivazione delle RNasi.

Assorbimento nella membrana QIAamp MinElute

Le condizioni di legame vengono regolate con aggiunta di etanolo per consentire un legame ottimale dell'RNA e del DNA virali alla membrana. Successivamente si trasferiscono i lisati a una QIAamp MinElute Column e gli acidi nucleici virali, al passaggio del lisato, vengono assorbiti sulla membrana in gel di silice per effetto della pressione indotta dal vuoto. Il sale e le condizioni del pH garantiscono che le proteine e gli altri contaminanti, che possono inibire la PCR e altre reazioni enzimatiche a valle, non siano trattiene dalla membrana QIAamp MinElute.

Rimozione dei residui contaminanti

Gli acidi nucleici restano legati alla membrana, mentre i contaminanti vengono dilavati efficacemente durante le 3 fasi di lavaggio.

Eluizione di acidi nucleici di virali

In un unico passaggio, RNA e DNA virale altamente puri vengono eluiti dalla membrana della QIAamp MinElute Column in tampone di eluizione (AVE), a temperatura ambiente. Le QIAamp MinElute Column consentono volumi di eluizione di 20 e 60 µl. Per applicazioni successive che richiedano piccoli volumi iniziali (ad es., alcuni esami PCR e RT-PCR), l'impiego di acidi nucleici virali eluiti in 20 µl di tampone di eluizione (AVE) può aumentare la sensibilità dell'esame.

Per applicazioni downstream che richiedono un volume iniziale maggiore, il volume di eluizione può essere portato a 60 µl. Un aumento del volume di eluizione diminuisce tuttavia la concentrazione degli acidi nucleici nell'eluato.

A causa del residuo di tampone di eluizione trattenuto dalla membrana della colonnina spin dopo la centrifugazione, il volume di eluito recuperato può essere inferiore al volume di tampone di eluizione applicato alla colonnina. Inoltre, il volume dell'eluato ottenuto dipende dalla natura del campione.

Gli acidi virali nucleici eluiti vengono raccolti in provette di eluizione (ET, in dotazione) e possono essere conservati a 2–8°C per un massimo di 24 ore. Per una conservazione a lungo termine che supera le 24 ore, si consiglia di mantenere gli acidi nucleici purificati ad una temperatura inferiore a 20°C.

Nota: la stabilità degli eluiti dipende in larga misura da vari fattori ed è correlata alla specifica applicazione downstream. È stata valutata per il QIAamp DSP Virus Kit in combinazione con applicazioni downstream esemplari. È responsabilità dell'utente consultare le istruzioni per l'uso della specifica applicazione downstream utilizzata nel proprio laboratorio e/o convalidare l'intero flusso di lavoro per stabilire le condizioni di conservazione appropriate.

Resa e qualità degli acidi nucleici virali

Le rese di acido nucleico virale isolato da campioni biologici sono di norma inferiori a 1 µg. Per determinare la resa si raccomandano metodi di amplificazione quantitativa. Quando si quantificano gli acidi nucleici isolati con il protocollo QIAamp DSP Virus, bisogna ricordare che nel campione sarà presente una quantità di RNA trasportatore molto superiore all'RNA virale.

L'RNA trasportatore svolge una duplice funzione. In primo luogo potenzia il legame degli acidi nucleici virali con la membrana QIAamp, soprattutto se il campione contiene un numero molto limitato di molecole target. Secondariamente, aggiungendo grandi quantità di RNA trasportatore si riduce la possibilità di degradazione dell'RNA virale, nel raro caso in cui le molecole delle RNasi non vengano denaturate dai sali caotropici e dal detergente nel tampone di lisi (AL). Se non si aggiunge RNA trasportatore al tampone di lisi (AL), si può osservare una diminuzione della quantità di DNA o RNA virale ottenuto.

Inoltre l'RNA trasportatore può rientrare nella composizione di alcuni reagenti per controllo interno degli esami downstream. In tali casi, consultare le istruzioni per l'uso fornite dal produttore dell'esame downstream.

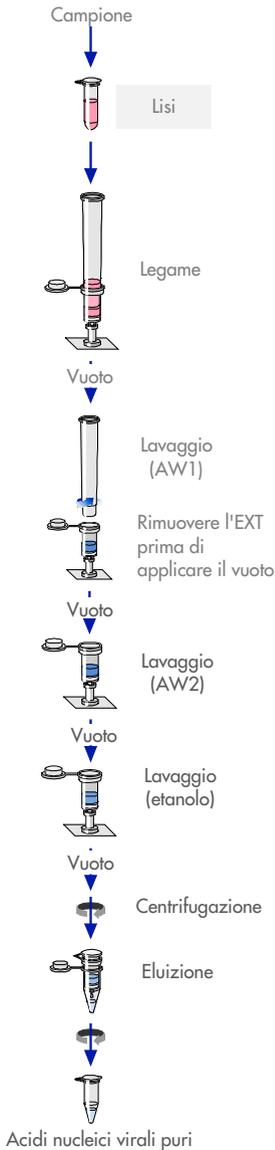
I diversi sistemi di amplificazione variano in termini di efficienza in funzione della quantità totale degli acidi nucleici presenti nella reazione. Gli eluiti di questo kit contengono sia acidi nucleici virali sia RNA trasportatore, e il quantitativo di RNA trasportatore supera di gran lunga quello degli acidi nucleici virali. Il calcolo della quantità di eluito da aggiungere alle reazioni di amplificazione a valle dovrebbe essere dunque essere preso in considerazione sulla quantità di RNA trasportatore aggiunta. Per ottenere il massimo livello di sensibilità nelle reazioni di amplificazione, potrebbe rendersi necessario regolare la quantità di soluzione di RNA trasportatore aggiunta al tampone di lisi (AL).

Aggiunta di controlli interni

L'uso del protocollo QIAamp DSP Virus in combinazione con i sistemi di amplificazione disponibili sul mercato potrebbe richiedere l'introduzione di un controllo interno nella procedura di purificazione. L'RNA o il DNA di controllo interno dovrebbero essere aggiunti al tampone di lisi insieme all'RNA trasportatore. Per un'efficienza ottimale della purificazione, le molecole per controllo interno devono avere una lunghezza superiore a 200 nucleotidi, perché l'efficienza di recupero delle molecole più piccole è inferiore.

Consultare le istruzioni del produttore per stabilire la concentrazione ottimale. L'uso di una concentrazione diversa da quella raccomandata potrebbe ridurre l'efficacia dell'amplificazione.

Procedura QIAamp DSP Virus



Prima di iniziare, leggere attentamente il protocollo (pag. 30).
 Nella provetta di lisi, aggiungere 75 µl di QP, 500 µl di campione e 500 µl di AL.
 Miscelare con vortex per 15 secondi.
 Incubare per 15 minuti a 56°C.
 Aggiungere 600 µl di etanolo.
 Miscelare con vortex per 15 secondi.
 Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (15–25°C).

Trasferire il lisato nella QIAamp MinElute Column con l'EXT attaccato.

Aggiungere 600 µl di AW1 ricostituito.

Rimuovere l'EXT.

Aggiungere 750 µl di AW2 ricostituito.

Aggiungere 750 µl di etanolo.

Posizionare la QIAamp MinElute Column nella WT.
 Centrifugare per 1 minuto a 14.000 rpm.
 Posizionare la QIAamp MinElute Column nella WT.
 Incubare per 3 minuti a 56°C.
 Posizionare la QIAamp MinElute Column nella ET.
 Aggiungere 20 µl o 60 µl di Buffer AVE.
 Incubare per 3 minuti a temperatura ambiente.
 Centrifugare per 1 minuto a 14.000 rpm.

Sommario e spiegazioni

Il QIAamp DSP Virus Kit si avvale di una tecnologia consolidata per isolare e purificare simultaneamente il DNA e l'RNA virale. La procedura QIAamp DSP Virus combina le proprietà di legame selettivo della membrana alla silice nei confronti degli acidi nucleici con volumi di eluizione minimi, pari a 20 o 60 µl.

La procedura è idonea per plasma e siero; entrambi possono contenere citrato o EDTA. I campioni possono essere appena prelevati, liofilizzati o congelati, purché non siano stati congelati e scongelati più di una volta.

Per la procedura del vuoto, sono richiesti un collettore da vuoto (ad esempio, il QIAvac 24 Plus con QIAvac Connecting System) e una pompa da vuoto in grado di produrre un vuoto di ~800–900 mbar (ad esempio, QIAGEN® Vacuum Pump). Per un facile monitoraggio della pressione indotta dal vuoto e un comodo rilascio del vuoto si deve utilizzare un Vacuum Regulator (componente del QIAvac Connecting System).

La procedura può essere usata per isolare l'RNA e il DNA virali da una vasta gamma di RNA e DNA di virus. La procedura è studiata per evitare la contaminazione crociata tra campioni e consentire la manipolazione in sicurezza dei campioni potenzialmente infetti. Inoltre, tale procedura è particolarmente appropriata per l'estrazione di più campioni contemporaneamente. Gli acidi nucleici virali vengono eluiti nel tampone di eluizione (AVE) e sono pronti per essere utilizzati in reazioni di amplificazione o per la conservazione a -20°C per utilizzi successivi.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

Numero di catalogo
QIAamp DSP Virus
Numero delle preparazioni

60704
50

QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Column with Wash Tubes (QIAamp MinElute Column con provette di lavaggio) (WT) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (Tubi di estensione) (3 ml)	COL EXT	50
ET	Elution Tubes (Provette di eluizione) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (Connettori per vuoto)	VAC CON	50
LT	Lysis Tubes (Provette di lisi) (2 ml)	LYS TUBE	50
WT	Wash tube (Provetta di lavaggio) (WT) (2 ml)	WASH TUBE	50
AL	Lysis Buffer* (Tampone di lisi)	LYS BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1 (Tampone di lavaggio 1) (AW1)* (concentrato)	WASH BUF 1 CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Tampone di lavaggio 2) (AW2)(concentrato)	WASH BUF 2 CON	13 ml
AVE	Elution Buffer† (Tampone di eluizione) (tappi viola)	ELU BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent (Solvente della proteasi)†	QPROT SOLV	4,4 ml
Carrier (Trasportatore)	Carrier RNA (RNA Trasportatore) (tappo rosso)	CAR RNA	310
QP	QIAGEN® Protease (Proteasi QIAGEN®)‡	QPROT	1 fiala
–	Istruzioni per l'uso (manuale)		1

* Contiene guanidina cloridrato. Non compatibile con disinfettanti contenenti candeggina. Per le informazioni sulla sicurezza, consultare pag. 14.

† Contiene azide di sodio come conservante

‡ Volume di risospensione: 4,4 ml

Componenti del kit

I principali componenti del kit contenenti principi attivi sono illustrati di seguito.

Reagente	Principi attivi	Concentrazione (p/p) [%]
QIAGEN Protease (QP)	Subtilisina	da ≥ 90 a ≤ 100
AL	Guanidina cloridrato Acido maleico	da ≥ 30 a < 50 da $\geq 0,1$ a < 1
AW!	Guanidina cloridrato	da ≥ 50 a < 70

Materiale necessario ma non in dotazione

Reagenti aggiuntivi

- Etanolo (96-100%)*

Materiali di consumo

- Pipette† e relativi puntali (per evitare la contaminazione crociata, si raccomanda vivamente di utilizzare puntali con barriere anti-aerosol)
- Guanti monouso

Strumentazione

- Blocco riscaldante† per la lisi dei campioni a 56°C per microprovette da 2,0 ml
- Microcentrifuga†
- Cilindro graduato (50 ml)
- Agitatore Vortex
- Apparato da vuoto QIAvac 24 Plus (n. cat. 19413) o altro equivalente†

* Non utilizzare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone.

† Prima dell'uso, assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

Avvertenze e precauzioni

Tenere presente che potrebbe essere richiesto di consultare le norme locali per la segnalazione al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità di regolamentazione del Paese dell'utente e/o del paziente di gravi incidenti verificatisi in relazione al dispositivo.

Per uso diagnostico in vitro.

Leggere attentamente tutte le istruzioni prima di utilizzare il kit.

Informazioni sulla sicurezza

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito www.qiagen.com/safety, dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e di ogni componente del kit QIAGEN.



ATTENZIONE: Non aggiungere candeggina o soluzioni acide nei rifiuti prodotti dalla preparazione dei campioni.

- Il tampone di lisi (AL) e il tampone di lavaggio 1 (AW1) contengono guanidina cloridrato, che può formare composti altamente reattivi in combinazione con la candeggina. Se si rovescia il liquido di questi tamponi, pulire con acqua e detergente da laboratorio idoneo. Se il liquido rovesciato contiene agenti potenzialmente infetti, pulire l'area interessata, prima con acqua e detergente da laboratorio, e successivamente con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% (v/v).

- Se i flaconi di tampone sono danneggiati o si riscontrano perdite, indossare guanti e occhiali di protezione al momento del loro smaltimento, onde evitare lesioni personali a sé o ad altri.
- QIAGEN non ha testato i liquidi di scarico generati dalla procedura QIAamp DSP Virus per la presenza di materiali infetti residui. Perciò, quando si lavora con questo prodotto, occorre adottare precauzioni universali (guanti, camice da laboratorio e protezioni oculari) per manipolare materiali umani potenzialmente infetti; inoltre i materiali di scarto liquidi devono essere considerati infetti e quindi manipolati ed eliminati in conformità con le normative locali sulla sicurezza.
- I campioni sono potenzialmente infettivi. Smaltire campioni e materiali di scarto dell'esame nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.

Informazioni di emergenza

CHEMTREC

USA e Canada 1-800-424-9300

Al di fuori di USA e Canada +1 703-527-3887

Precauzioni

Al QIAamp DSP Virus Kit sono associate le seguenti informazioni su rischi e misure precauzionali.

Lysis Buffer (AL)



Contiene: guanidina cloridrato; acido maleico. Avvertenza! Può essere nocivo se ingerito o inalato. Causa irritazione cutanea. Può provocare una reazione allergica cutanea. Causa grave irritazione agli occhi. Indossare guanti/abbigliamento protettivo/protezione per gli occhi/la faccia. In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti.

Wash Buffer 1 (AW1)



Contiene guanidina cloridrato. Avvertenza! Nocivo se ingerito o inalato. Causa irritazione cutanea. Causa grave irritazione agli occhi. Indossare guanti/abbigliamento protettivo/protezione per gli occhi/la faccia. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti.

QIAGEN Protease (QP)



Contiene: subtilisina. Pericolo! Nocivo se ingerito. Causa irritazione cutanea. Causa grave danno oculare. Se inalato, può causare sintomi di asma e allergia o difficoltà respiratorie. Può essere irritante per le vie respiratorie. Evitare di respirare le polveri/i fumi/i gas/il prodotto nebulizzato/i vapori/gli aerosol. Indossare guanti/abbigliamento protettivo/protezione per gli occhi/la faccia. Indossare una protezione per la respirazione. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. IN CASO DI esposizione o di possibile esposizione: Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Portare la persona all'aria aperta e mantenerla tranquilla in posizione confortevole per la respirazione.

Smaltimento

I materiali di scarto contengono campioni e reagenti. Tali materiali di scarto possono contenere materiali tossici o infettivi, pertanto devono essere opportunamente smaltiti. Consultare le normative di sicurezza locali per le corrette procedure di smaltimento.

Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede SDS in formato PDF sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile reperire, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Prestare attenzione alle date di scadenza e alle condizioni di conservazione stampate sulla confezione e sulle etichette di tutti i componenti. Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.

Conservare le QIAamp MinElute Column a 2–8°C dopo la consegna del kit. Se conservate correttamente, le QIAamp MinElute Column sono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla rispettiva scatola.

Nota: per garantire che i componenti del kit non vengano mescolati, etichettare le QIAamp MinElute Column con il rispettivo numero di lotto del kit.

Tutti i tamponi possono essere conservati a temperatura ambiente (15–25°C) fino alla data di scadenza indicata sulla scatola del kit.

L'RNA trasportatore liofilizzato può essere conservato a temperatura ambiente fino alla data di scadenza indicata sulla scatola del kit.

La QIAGEN Protease (QP) liofilizzata può essere conservata a temperatura ambiente fino alla data di scadenza, senza alcuna perdita di prestazioni.

Stabilità durante l'uso

L'RNA trasportatore può essere disciolto soltanto nel tampone di eluizione (AVE); l'RNA trasportatore disciolto deve essere aggiunto immediatamente al tampone di lisi (AL), come descritto a pagina 24. Questa soluzione deve essere preparata al momento e rimane stabile max. 48 ore se conservata a 2–8 °C. Le porzioni inutilizzate di RNA trasportatore disciolto nel tampone di eluizione (AVE) devono essere congelate in aliquote a -20°C.

La QIAGEN Protease (QP) ricostituita in solvente per proteasi (PS) è stabile fino a 1 anno se conservata a 2–8°C, ma solo fino alla data di scadenza. Evitare di tenere a temperatura ambiente per lunghi periodi la soluzione madre di QIAGEN Protease (QP).

Il tampone di lavaggio 1 (AW1) ricostituito e il tampone di lavaggio 2 (AW2) ricostituito sono stabili per 1 anno se conservati a temperatura ambiente ma solo fino alla data di scadenza indicata sulla scatola del kit.

Raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni

Nota: la stabilità del campione dipende in larga misura da vari fattori ed è correlata alla specifica applicazione downstream. È stata valutata in combinazione con applicazioni downstream esemplari. È responsabilità dell'utente consultare le istruzioni per l'uso della specifica applicazione downstream utilizzata nel proprio laboratorio e/o convalidare l'intero flusso di lavoro per stabilire le condizioni di conservazione appropriate.

Per suggerimenti generali sulla raccolta, il trasporto e la conservazione, consultare la linea guida approvata dal CLSI MM13-A "Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods". Inoltre, durante la preparazione, la conservazione, il trasporto e la manipolazione dei campioni in generale, devono essere seguite le istruzioni del produttore del dispositivo di raccolta dei campioni selezionato.

La procedura di purificazione è ottimale per l'uso con campioni di plasma e siero umani. È possibile utilizzare campioni di sangue trattati con EDTA oppure citrato come anticoagulante per la preparazione del plasma. I campioni possono essere sia freschi che congelati, a condizione che non siano stati congelati e scongelati più di una volta. Scongelare i campioni con una leggera agitazione per garantirne un'accurata miscelazione.

Dopo il prelievo e la centrifugazione, è possibile conservare plasma e siero a 2–8°C per un massimo di 6 ore. Per una conservazione a lungo termine, è consigliato il congelamento a una temperatura compresa tra -80°C e -20°C in aliquote. I campioni di siero e plasma non devono essere scongelati più di una volta. Il congelamento–decongelamento ripetuto causa la denaturazione e la precipitazione delle proteine, con la conseguente riduzione dei titoli virali e quindi delle rese di acidi nucleici virali. Inoltre, i crioprecipitati che si formano durante il congelamento e lo scongelamento ripetuti ostruiscono la membrana della QIAamp MinElute Column. Se sono visibili crioprecipitati, farli sedimentare per centrifugazione a circa 6800 x g per 3 minuti. Aspirare e processare immediatamente il sovrantante limpido, senza toccare il pellet. Avviare immediatamente il processo di purificazione. La centrifugazione a basse forze-g non causa la riduzione dei titoli virali.

Nota: Secondo studi di interferenza esemplari per il QIAamp DSP Virus Kit e in linea con la norma ISO 20186-2:2019(E), l'eparina presente nelle provette di raccolta del sangue può influire sulla purezza degli acidi nucleici isolati e il possibile carryover negli eluiti può causare inibizioni in alcune applicazioni downstream. Pertanto, si consiglia di utilizzare campioni di sangue trattati con EDTA o citrato come anticoagulante.

Note importanti

Punti importanti prima di iniziare

- Dopo la ricezione, verificare che i componenti del kit non siano danneggiati. Se le confezioni blister o i flaconi di tampone appaiono danneggiati, rivolgersi ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale. In caso di fuoriuscita di liquidi, fare riferimento a “Avvertenze e precauzioni” (pag. 14). Non utilizzare componenti del kit danneggiati, poiché potrebbero limitare il rendimento del kit.
- Utilizzare sempre attrezzature esenti da RNasi.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali per pipetta. Per limitare al minimo il rischio di contaminazione crociata, si consiglia di utilizzare puntali per pipette con barriera aerosol anticontaminazione.
- Utilizzare sempre guanti monouso e controllare regolarmente che non siano contaminati con materiale dei campioni.
- Se i guanti risultano contaminati, eliminarli; tale procedura deve essere applicata anche a tutte le fasi contrassegnate dal simbolo del guanto. 
- Per limitare al minimo il rischio di contaminazione crociata, aprire soltanto una provetta per volta.
- Dopo tutte le fasi di centrifugazione con vortex a pulsazione, centrifugare brevemente le provette per microcentrifuga per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.
- Tutte le fasi di centrifugazione hanno luogo a temperatura ambiente (15–25°C).
- L'utente deve prestare attenzione a mantenere sempre la tracciabilità dei campioni durante l'intero processo.
- Non utilizzare contemporaneamente componenti di più kit per la stessa procedura, a meno che i numeri di lotto non siano identici.
- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti del kit.

- Per ridurre al minimo il rischio di infezione dovuto a materiale potenzialmente infetto, si raccomanda di operare in condizioni di flusso d'aria laminare finché non ha avuto luogo la lisi dei campioni.
- La procedura fornisce le istruzioni per elaborare un singolo campione di plasma o siero. Tuttavia, l'apparato da vuoto QIAvac 24 Plus permette di elaborare simultaneamente fino a 24 campioni.
- Il kit deve essere utilizzato esclusivamente da personale esperto nelle pratiche di laboratorio per la diagnostica in vitro.

Manipolazione delle QIAamp MinElute Column

A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, per la manipolazione delle QIAamp MinElute Column occorre osservare le seguenti precauzioni per evitare la contaminazione crociata tra le preparazioni dei campioni:

- Applicare con cura il campione o la soluzione alla QIAamp MinElute Column. Pipettare il campione nella QIAamp MinElute Column senza bagnare il bordo della colonna.
- Tra un trasferimento e l'altro di liquidi, sostituire sempre i puntali delle pipette. Si consiglia vivamente l'uso di puntali per pipetta con barriera aerosol anticontaminazione.
- Evitare di toccare la membrana QIAamp MinElute con il puntale per pipetta.
- Aprire una sola QIAamp MinElute Column per volta, facendo attenzione a non generare aerosol.

Preparazione di reagenti e tamponi

Preparazione dell'RNA

Quando si prepara l'RNA virale, operare rapidamente durante le fasi manuali della procedura e leggere l'Appendice a pag. 46 prima di iniziare.

Preparazione della QIAGEN Protease (QP)

Aggiungere l'intero contenuto della fiala di solvente della proteasi (PS), ovvero 4,4 ml, alla provetta contenente la QIAGEN Protease (QP) liofilizzata e miscelare con cura. Per evitare la formazione di schiuma, miscelare capovolgendo la fiala diverse volte. Assicurarsi che la QIAGEN Protease (QP) sia completamente disciolta.



Non aggiungere la QIAGEN Protease (QP) direttamente al tampone di lisi (AL)*.

Aggiunta di RNA trasportatore e controllo interno al tampone di lisi (AL)*

Si raccomanda fortemente l'impiego di un controllo interno quando si utilizza QIAamp DSP Virus Kit in combinazione con sistemi di amplificazione diagnostici. Per ulteriori informazioni, vedere le istruzioni fornite dal produttore. In questo caso occorre aggiungere al tampone di lisi (AL) controllo interno e RNA trasportatore ricostituito, quindi miscelarli delicatamente, capovolgendo la provetta 10 volte. Per evitare la formazione di schiuma, non utilizzare il vortex. Se si utilizza un controllo interno, ridurre di conseguenza il volume del tampone di lisi (AL) (per ulteriori dettagli, vedere la Tabella 1).

Consultare le istruzioni del produttore per stabilire la concentrazione ottimale del controllo interno. L'uso di una concentrazione diversa da quella consigliata può generare risultati scorretti. Quando si calcola la quantità appropriata di controllo interno da utilizzare, tenere in considerazione il volume iniziale del campione e quello di eluizione. Occorre ricordare che il QIAamp DSP Virus Kit impiega un volume di campione iniziale pari a 500 µl.

*Contiene sale caotropico. Adottare adeguate misure di sicurezza da laboratorio e indossare guanti durante la manipolazione. Non compatibile con disinfettanti contenenti candeggina. Per le informazioni sulla sicurezza, consultare pag. 14.

Per preparare la soluzione di RNA trasportatore, aggiungere 310 µl di tampone di eluizione (AVE) alla provetta contenente 310 µg di RNA trasportatore liofilizzato, ottenendo quindi una soluzione di 1 µg/µl. Disciogliere completamente l'RNA trasportatore, suddividerlo in aliquote di dimensioni opportune e conservarlo a una temperatura di -20°C. Non congelare e scongelare le aliquote di RNA trasportatore più di 3 volte.



L'RNA trasportatore non si discioglie nel tampone di lisi (AL). È prima necessario discioglierlo nel tampone di eluizione (AVE) e successivamente aggiungerlo al tampone di lisi (AL). Assicurarsi che l'RNA trasportatore sia completamente disciolto nel volume appropriato di tampone di eluizione (AVE), prima di miscelarlo con il tampone di lisi (AL).

Calcolare il volume della miscela tampone di lisi (AL)/RNA trasportatore per gruppo di campioni della Tabella 1 il numero di campioni da elaborare contemporaneamente. I volumi si calcolano tramite il seguente semplice calcolo:

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

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

dove: **n** = numero di campioni da elaborare simultaneamente

y = volume calcolato del tampone di lisi (AL)

z = volume di RNA trasportatore/tampone di eluizione (AVE) da aggiungere al tampone di lisi (AL)

Miscelare delicatamente la provetta capovolgendola 10 volte. Per evitare la formazione di schiuma, non utilizzare il vortex.

Tabella 1. Volumi di tampone di lisi (AL) e RNA trasportatore/tampone di eluizione (AVE) richiesti per la procedura QIAamp DSP Virus*

N. campioni	Vol. AL* (ml)	Vol. RNA trasportatore/AVE (µl)	N. campioni	Vol. AL* (ml)	Vol. RNA trasportatore/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



La procedura di preparazione dei campioni è ottimale per 5,6 µg di RNA trasportatore per campione. Se una minore quantità di RNA trasportatore dimostra di essere più indicata per un determinato sistema di amplificazione, trasferire solo la quantità necessaria di RNA trasportatore disciolta nelle provette contenenti tampone di lisi (AL). Per ogni microgrammo di RNA trasportatore necessario per ogni preparazione, aggiungere 5 µl di RNA trasportatore disciolto in Buffer AVE per ogni millilitro di tampone di lisi (AL). L'uso di meno di 5,6 µg di RNA trasportatore per campione deve essere convalidato per ogni particolare tipo di campione e di esame downstream.

*Se si utilizza un controllo interno, ridurre di conseguenza il volume del tampone di lisi (AL).

Preparazione del tampone di lavaggio 1 (AW1)*

Utilizzando un cilindro graduato, aggiungere 25 ml di etanolo (96–100%) nel flacone contenente 19 ml di tampone di lavaggio 1 (AW1) concentrato. Spuntare la casella sull'etichetta per indicare che è stato aggiunto etanolo. Conservare il tampone di lavaggio 1 (AW1) ricostituito a temperatura ambiente (15–25°C).



Miscelare sempre il tampone di lavaggio 1 (AW1) ricostituito, capovolgendo il flacone più volte prima di iniziare la procedura.

Preparazione del tampone di lavaggio 2 (AW2)†

Utilizzando un cilindro graduato, aggiungere 30 ml di etanolo (96–100%) nel flacone contenente 13 ml di tampone di lavaggio 2 (AW2) concentrato. Spuntare la casella sull'etichetta per indicare che è stato aggiunto etanolo. Conservare il tampone di lavaggio 2 (AW2) ricostituito a temperatura ambiente (15–25°C).



Miscelare sempre il tampone di lavaggio 2 (AW2) ricostituito, capovolgendo il flacone più volte prima di iniziare la procedura.

Preparazione del tampone di eluizione (AVE)

Il kit comprende quattro provette di tampone di eluizione (AVE). Fare attenzione a non contaminare il tampone con RNasi. Se si eseguono 4 procedure di purificazione, o meno, con un solo kit, si consiglia di eliminare la provetta del tampone di eluizione (AVE) al termine di ciascuna procedura.

* Contiene sale caotropico. Adottare adeguate misure di sicurezza da laboratorio e indossare guanti durante la manipolazione. Non compatibile con disinfettanti contenenti candeggina. Per le informazioni sulla sicurezza, consultare pag. 14.

† Contiene azide di sodio come conservante.

Impostazione dell'apparato da vuoto QIAvac 24 Plus

Assicurarsi di aver installato correttamente il tubo di estensione (EXT), la QIAamp MinElute Column, il VacConnector (VC) e la VacValve (vedere Figura 1).

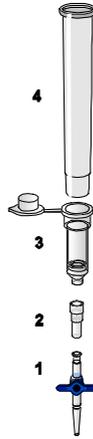


Figura 1. Montaggio dei componenti del QIAamp DSP Virus Kit per l'estrazione sottovuoto dei campioni:

- | | |
|--|-----------------------------|
| 1. VacValve (in dotazione con l'apparato da vuoto) | 3. QIAamp MinElute column |
| 2. VacConnector (VC) | 4. Tubi di estensione (EXT) |

Si consiglia di etichettare le provette di lisi (LT), le provette di eluizione (ET) e le QIAamp MinElute Column per l'impiego nell'apparato da vuoto QIAvac 24 Plus secondo lo schema in Figura 2, da non confondere i campioni. Per praticità, è possibile fotocopiare la figura e apporvi le etichette dei nomi dei campioni.

Data: _____

Operatore: _____

ID esecuzione: _____

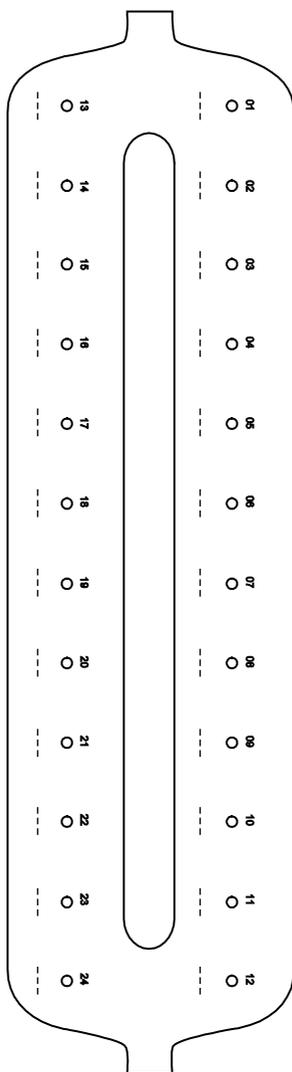


Figura 2. Schema di etichettatura per provette di lisi (LT), provette di eluizione (ET) e QIAamp MinElute Column da utilizzare nell'apparato da vuoto QIAvac 24 Plus.

Protocollo: isolamento e purificazione degli acidi nucleici virali da plasma e siero

Per isolare e purificare acidi nucleici virali da 500 µl di plasma o siero trattati con EDTA o citrato.

Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Lasciar equilibrare i campioni a temperatura ambiente (15–25°C) e assicurarsi che siano adeguatamente miscelati.
- Assicurarsi che tutti i reagenti e le QIAamp MinElute Column (in blister chiusi) siano stabilizzati a temperatura ambiente.
- Impostare un blocco riscaldante a 56°C per utilizzarlo nel passaggio 4 e 17.
- Assicurarsi che il tampone di lavaggio 1 (AW1) il tampone di lavaggio 2 (AW2) e la QIAGEN Protease (QP) siano stati preparati secondo le istruzioni fornite nella sezione “Punti importanti prima di iniziare” a pagina 22.
- Se si è formato un precipitato nel tampone di lisi (AL), scioglierlo con un’incubazione a 56°C.
- Aggiungere l’RNA trasportatore ricostituito in tampone di eluizione (AVE) o il controllo interno al tampone di lisi (AL), secondo le istruzioni a pagina 24.
- Se possibile, usare tampone di eluizione (AVE) appena preparato per ogni procedura (sono fornite 4 provette).
- Per limitare al minimo la contaminazione crociata, inserire un VacConnector (VC) in ciascun adattatore luer dell’apparato da vuoto.
- Le procedure di controllo qualità di QIAGEN comprendono l’esecuzione di test funzionali sul rilascio dei kit condotti sui singoli lotti di kit. Pertanto, non miscelare reagenti appartenenti a lotti di kit diversi e non unire singoli reagenti provenienti da lotti di reagenti diversi.

- Assicurarsi che nell'apparato da vuoto il flacone di scarico sia vuoto e che tutti i raccordi siano collegati correttamente.
- Per ulteriori informazioni sul funzionamento dell'apparato da vuoto, in particolare sulla manutenzione, consultare il manuale fornito in dotazione con tale attrezzatura.

Procedura

1. Pipettare 75 µl di QIAGEN Protease (QP) in una provetta di lisi (LT).



Prima dell'uso, controllare la data di scadenza della proteasi ricostituita.

2. Aggiungere 500 µl di plasma o siero alla provetta di lisi (LT).
3. Aggiungere 500 µl di tampone di lisi (AL) (contenente 11,2 µg/ml di RNA trasportatore) alla provetta di lisi (LT), chiudere il tappo della provetta e miscelare mediante uso di un vortex per ≥ 15 secondi.

Per assicurare una lisi efficace, è essenziale miscelare con cura il campione e il tampone di lisi (AL), in modo da ottenere una soluzione omogenea.



Il tampone di lisi (AL) comprende un controllo interno. Poiché il tampone di lisi (AL) presenta un'elevata viscosità, assicurarsi di aggiungerne il volume appropriato pipettando accuratamente.



Non aggiungere la QIAGEN Protease (QP) direttamente al tampone di lisi (AL).

4. Incubare a 56°C per 15 minuti.
5. Centrifugare la provetta di lisi (LT) per ≥ 5 secondi alla velocità massima per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.



6. Cambiarsi i guanti e aprire con cautela la provetta di lisi (LT).
7. Aggiungere 600 µl di etanolo (96–100%) alla provetta di lisi (LT), chiudere il tappo della provetta e miscelare il campione mediante centrifugazione a impulsi con vortex per ≥ 15 secondi. Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (15–25°C).

8. Centrifugare la provetta di lisi (LT) per ≥ 5 secondi alla velocità massima per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.
9. Inserire la QIAamp MinElute Column nel VacConnector (VC) sull'apparato da vuoto (vedere Figure 1 a pagina 28). Inserire un tubo di estensione (EXT) nella QIAamp MinElute Column aperta.



Mettere da parte la provetta di lavaggio (WT) per la centrifugazione, da effettuare al passaggio 16.



10. Cambiarsi i guanti e aprire soltanto una provetta per volta.

11. Applicare con cautela l'intero lisato del passaggio 7 nel tubo di estensione (EXT) della QIAamp MinElute Column, senza bagnarne il bordo.

12. Azionare la pompa da vuoto. Dopo l'aspirazione del lisato attraverso la QIAamp MinElute Column, aprire la valvola dell'apparato da vuoto e rilasciare il vuoto.

Se si utilizzano varie QIAamp MinElute Column simultaneamente, si consiglia di chiudere la VacValve di ogni colonnina dopo il passaggio del lisato, in modo da limitare la durata di questa fase.



Se dopo 15 minuti il lisato non è ancora passato completamente attraverso la membrana, eliminare la QIAamp MinElute Column e ripetere la procedura con un nuovo campione.



Utilizzare la valvola dell'apparato da vuoto per rilasciare rapidamente la pressione.

13. Applicare 600 μ l di tampone di lavaggio 1 (AW1) alla QIAamp MinElute Column. Rimuovere con cautela ed eliminare il tubo di estensione (EXT), quindi chiudere la valvola dell'apparato da vuoto. Dopo l'aspirazione del tampone di lavaggio 1 (AW1) attraverso la QIAamp MinElute Column, aprire la valvola e rilasciare il vuoto.



Per evitare la contaminazione crociata, verificare che i tubi di estensione (EXT) non passino sopra le QIAamp MinElute Column vicine.

14. Applicare 750 µl di tampone di lavaggio 2 (AW2) alla QIAamp MinElute Column, senza bagnarne il bordo. Lasciare aperto il coperchio della colonnina e chiudere la valvola dell'apparato da vuoto. Dopo l'aspirazione del tampone di lavaggio 2 (AW2) attraverso la QIAamp MinElute Column, aprire la valvola e rilasciare il vuoto.
15. Applicare 750 µl di etanolo (96–100%) alla QIAamp MinElute Column, senza bagnarne il bordo. Lasciare aperto il coperchio della colonnina e chiudere la valvola dell'apparato da vuoto. Dopo l'aspirazione dell'etanolo attraverso la QIAamp MinElute Column, aprire la valvola e rilasciare il vuoto.



Per applicare l'etanolo alla QIAamp MinElute Column, usare puntali per pipette dotati di barriera anti-aerosol.

16. Chiudere il coperchio della QIAamp MinElute Column, rimuoverla dall'apparato da vuoto ed eliminare il VacConnector (VC). Posizionare la QIAamp MinElute Column nella provetta di lavaggio (WT) messa da parte nel passaggio 9 e centrifugare alla velocità massima (circa 20.000 x g o 14.000 rpm) per 1 minuto, in modo da asciugare la membrana completamente. Eliminare la provetta di lavaggio (WT) contenente il filtrato.



Se la membrana non viene asciugata per centrifugazione, potrebbe risultare impossibile eseguire l'esame downstream.

17. Posizionare la QIAamp MinElute Column in una provetta di lavaggio (WT) nuova e incubare con il coperchio aperto a 56°C per 3 minuti, per far evaporare tutti gli eventuali liquidi rimanenti.
18. Posizionare la QIAamp MinElute Column in una provetta di eluizione (ET) pulita, quindi eliminare la provetta di lavaggio (WT). Aprire con cautela il coperchio della QIAamp MinElute Column e aggiungere 20 µl o 60 µl di tampone di eluizione (AVE) (a seconda del test downstream) nel centro della membrana.

 È importante utilizzare una nuova provetta di eluizione per evitare la contaminazione con i tamponi di lavaggio residui che potrebbero causare l'inibizione degli esami downstream.

 La dispensazione del tampone di eluizione al centro della membrana è particolarmente importante per i volumi di eluizione più piccoli, per garantire un recupero ottimale degli acidi nucleici e del tampone di eluizione.

 Il volume di eluizione può essere adattato alle esigenze dell'applicazione downstream. Ricordare che il volume dell'eluato recuperato può essere inferiore al volume del tampone di eluizione applicato alla colonna a causa del tampone di eluizione rimanente trattenuto dalla membrana della colonnina spin dopo la centrifugazione.

 Accertarsi che il tampone di eluizione sia stabilizzato a temperatura ambiente.

19. Chiudere il coperchio e incubare a temperatura ambiente (15–25°C) per ≥3 minuti. Centrifugare alla velocità massima (circa 20.000 x g o 14.000 rpm) per 1 minuto, in modo da eluire gli acidi nucleici virali.

 Orientare i coperchi delle provette di eluizione in modo che siano rivolti nel senso opposto alla rotazione del rotore (ad esempio, se il rotore ruota in senso orario, orientare i coperchi in senso antiorario).

 Dopo l'esecuzione del protocollo, attenersi alla procedura di manutenzione dell'apparato da vuoto (per ulteriori informazioni, consultare il manuale in dotazione con tale attrezzatura).

Controllo di qualità

In conformità al Sistema di gestione della qualità totale certificato da QIAGEN, ogni lotto di QIAamp DSP Virus Kit viene testato rispetto a specifiche prestabilite, per garantire la costante qualità del prodotto.

Limitazioni

Le prestazioni del sistema sono state dimostrate in studi di valutazione delle prestazioni per la purificazione di acidi nucleici virali provenienti da campioni di plasma e siero umani.

È responsabilità dell'utente verificare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia stata già oggetto di uno studio di valutazione delle prestazioni da parte di QIAGEN.

Per minimizzare il rischio di un impatto negativo sui risultati diagnostici, è necessario ricorrere ad adeguati controlli delle applicazioni downstream. Eventuali risultati diagnostici generati dal sistema devono essere interpretati in combinazione con gli esiti di altri esami clinici o di laboratorio.

Caratteristiche delle prestazioni

Le caratteristiche delle prestazioni applicabili sono disponibili nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo www.qiagen.com.

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (Frequently Asked Questions, FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti dei Servizi tecnici QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e/o protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni ed esami (per i dati di contatto visitare il sito www.qiagen.com).

Commenti e suggerimenti

Raccomandazioni generali per il trattamento

- a) Ostruzione dei puntali delle pipette durante il trasferimento dei campioni
- Campioni congelati non miscelati correttamente dopo lo scongelamento. Scongelare i campioni con una leggera agitazione per garantirne un'accurata miscelazione. Crioprecipitati che si formano durante il congelamento e lo scongelamento ripetuti ostruiscono la membrana QIAamp MinElute. Nel caso in cui siano visibili crioprecipitati, eliminare il campione mediante centrifugazione per 5 minuti a 16.000 x g.
- b) QIAamp MinElute Column ostruite
- Se la portata è ridotta, la durata del vuoto può essere prolungata.
- In alternativa, chiudere la VacValve, se la si utilizza, e rimuovere con attenzione il gruppo tubo di estensione-VacConnector-VacValve dalla QIAamp MinElute Column senza perdere il lisato nel tubo di estensione.
- Rimuovere la QIAamp MinElute Column dal collettore da vuoto, posizionarla in una provetta di lavaggio (WT) da 2 ml e ruotarla a piena velocità fino a quando il campione non sia passato completamente attraverso la membrana. Riposizionare il gruppo tubo di estensione-VacConnector-VacValve che contiene il lisato rimanente. Accendere la pompa del vuoto, aprire la VacValve e continuare a caricare il lisato rimanente.
- Ripetere la procedura precedente se la QIAamp MinElute Column a intasarsi.

Commenti e suggerimenti

Crioprecipitati che si formano durante il congelamento e lo scongelamento ripetuti ostruiscono la membrana della QIAamp MinElute Column. Nel caso in cui siano visibili crioprecipitati, eliminare il campione mediante centrifugazione per 5 minuti a 16.000 x g. L'uso di etanolo raffreddato con ghiaccio durante la lisi può contribuire a ridurre il rischio di ostruzione della membrana. Inoltre, è essenziale aggiungere i tamponi per la lisi nell'ordine corretto descritto sopra. Non aggiungere la QIAGEN Protease (QP) direttamente al tampone di lisi (A1).

- c) Formazione di precipitato nel tampone di lisi Sciogliere mediante incubazione del tampone di lisi (A1) a 56°C.
- d) Volumi di eluizione variabili Il volume dell'eluato ottenuto dipende dalla natura del campione.
A causa del residuo di tampone di eluizione trattenuto dalla membrana della colonnina spin dopo la centrifugazione, il volume di eluito recuperato può essere inferiore al volume di tampone di eluizione applicato alla colonnina.
Applicare il tampone di eluizione al centro della membrana. La dispensazione del tampone di eluizione al centro della membrana è particolarmente importante per i volumi di eluizione più piccoli, per garantire un recupero ottimale degli acidi nucleici e del tampone di eluizione.
- e) Pressione di vuoto da ~800 a ~900 mbar non raggiunta Il collettore da vuoto non è chiuso ermeticamente. Premere il coperchio del collettore da vuoto dopo l'attivazione del vuoto. Controllare se è stata raggiunta la pressione del vuoto. La guarnizione del coperchio del QIAvac è consumata. Controllare visivamente la tenuta del collettore e sostituirla se necessario.
Le VacValves si sono consumate. Rimuovere tutte le VacValves e inserire i VacConnectors direttamente nelle estensioni luer. Inserire la QIAamp MinElute Column VacConnectors, chiudere il tappo delle colonne e azionare il vuoto. Controllare se è stata raggiunta la pressione del vuoto. Sostituire le VacValves, se necessario.
La connessione alla pompa del vuoto non è a tenuta stagna. Chiudere tutte le estensioni luer con tappi luer e azionare la pompa del vuoto. Controllare se la pressione del vuoto

Commenti e suggerimenti

è stabile dopo l'azionamento della pompa (e la valvola del Vacuum Regulator è chiusa).
Sostituire le connessioni tra pompa e collettore da vuoto, se necessario.

Se la pressione del vuoto non viene ancora raggiunta, sostituire la pompa da vuoto con una più forte.

Prestazioni del DNA insoddisfacenti nelle reazioni downstream

- a) Lisi dei campioni incompleta
- Se la QIAGEN Protease (QP) è stata sottoposta a temperature elevate per un tempo prolungato, può ridurre la sua capacità d'azione. Ripetere la procedura utilizzando nuovi campioni e QIAGEN Protease (QP) fresca.
- Assicurarsi di sciogliere la QIAGEN Protease (QP) con il solvente per proteasi secondo le istruzioni sopra riportate. Per evitare la formazione di schiuma, miscelare capovolgendo la fiala diverse volte. Assicurarsi che la QIAGEN Protease (QP) sia completamente disciolta. Non aggiungere la QIAGEN Protease (QP) direttamente al tampone di lisi (AL).
- Per assicurare una lisi efficace, è essenziale miscelare con cura il campione e il tampone di lisi (AL), in modo da ottenere una soluzione omogenea. Poiché il tampone di lisi (AL) presenta un'elevata viscosità, assicurarsi di aggiungerne il volume appropriato pipettando accuratamente o utilizzando una pipetta adeguata.
- b) Bassa percentuale di etanolo utilizzata invece del 96–100%
- Ripetere la procedura di purificazione con nuovi campioni e il 96–100% di etanolo. Non utilizzare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone.
- c) Tampone di lavaggio 1 (AW1) o tampone di lavaggio 2 (AW2) preparato in modo non corretto
- Assicurarsi che i concentrati di tampone di lavaggio 1 (AW1) e tampone di lavaggio 2 (AW2) siano stati diluiti con il corretto volume di etanolo al 96–100% e miscelati capovolgendo il flacone più volte prima di iniziare la procedura.

Commenti e suggerimenti

- d) I campioni di plasma e siero non sono stati preparati, conservati o miscelati correttamente.
- La procedura di purificazione è ottimale per l'uso con campioni di plasma e siero umani. È possibile utilizzare campioni di sangue trattati con EDTA oppure citrato come anticoagulante per la preparazione del plasma. Dopo il prelievo e la centrifugazione, è possibile conservare plasma e siero a 2–8°C per un massimo di 6 ore. Per una conservazione a lungo termine, è consigliato il congelamento a una temperatura compresa tra -80°C e -20°C in aliquote.
- I campioni di siero e plasma non devono essere scongelati più di una volta. Il congelamento–decongelamento ripetuto causa la denaturazione e la precipitazione delle proteine, con la conseguente riduzione dei titoli virali e quindi delle rese di acidi nucleici virali.
- Scongela i campioni con una leggera agitazione per garantirne un'accurata miscelazione.
- e) DNA scarso o assente nell'eluato
- Aumentare la quantità di eluito aggiunto alla reazione, se possibile.
- f) Volume di eluizione inadeguato utilizzato
- Stabilire il massimo volume di eluito adatto per la vostra applicazione a valle. Ridurre o aumentare di conseguenza il volume di eluito aggiunto all'applicazione a valle. Il volume di eluizione può essere adattato in proporzione. L'eluizione con volumi minori di Buffer AVE determina concentrazioni più elevate di acido nucleico.
- g) Carryover di un potenziale inibitore
- Assicurarsi di eseguire la fase di centrifugazione a secco prima dell'eluizione per evitare la potenziale inibizione degli esami downstream.
- È importante utilizzare una nuova provetta di eluizione per evitare la contaminazione con i tamponi di lavaggio residui che potrebbero causare l'inibizione degli esami downstream.
- Secondo studi di interferenza esemplari per il QIAamp DSP Virus Kit e in linea con la norma ISO 20186-2:2019(E), l'eparina presente nelle provette di raccolta del sangue può influire sulla purezza degli acidi nucleici isolati e il possibile carryover negli eluiti può causare inibizioni in alcune applicazioni downstream. Pertanto, si consiglia di utilizzare campioni di sangue trattati con EDTA o citrato come anticoagulante.

Commenti e suggerimenti

- h) RNA trasportatore degradato/preparato in modo non corretto
- L'RNA trasportatore svolge una duplice funzione. In primo luogo potenzia il legame degli acidi nucleici virali con la membrana QIAamp, soprattutto se il campione contiene un numero molto limitato di molecole target. Secondariamente, aggiungendo grandi quantità di RNA trasportatore si riduce la possibilità di degradazione dell'RNA virale, nel raro caso in cui le molecole delle RNasi non vengano denaturate dai sali caotropici e dal detergente nel tampone di lisi (AL).
- Se non si aggiunge RNA trasportatore al tampone di lisi (AL), si può osservare una diminuzione della quantità di DNA o RNA virale ottenuto.
- L'RNA trasportatore può essere disciolto soltanto nel Buffer AVE; l'RNA trasportatore disciolto deve essere aggiunto immediatamente al tampone di lisi (AL).
- Inoltre l'RNA trasportatore può rientrare nella composizione di alcuni reagenti per controllo interno degli esami downstream. In tali casi, consultare le istruzioni per l'uso fornite dal produttore dell'esame downstream.

Simboli

I seguenti simboli compaiono nelle istruzioni per l'uso o su confezioni ed etichette:

Simbolo

Definizione del simbolo



<N>

Contenuto di reagenti sufficiente per <N> reazioni



Data di scadenza



Questo prodotto soddisfa i requisiti del Regolamento europeo 2017/746 per i dispositivi medico-diagnostici in vitro.

IVD

Dispositivo medico-diagnostico in vitro

REF

Numero di catalogo

LOT

Numero di lotto

MAT

Numero di materiale (vale a dire, l'etichetta del componente)

COMP

Componenti

VOL

Volume

CONT

Contenuto

NUM

Numero

GTIN

Codice GTIN

R_n

R sta per revisione delle istruzioni per l'uso e n è il numero di revisione



Limite di temperatura

Simbolo

Definizione del simbolo



Produttore



Consultare le istruzioni per l'uso



Tenere al riparo dalla luce



Avvertenza/Cautela



Al momento della consegna



Nota importante



Cambiarsi i guanti dopo il passaggio del protocollo con questo simbolo



Aprire alla consegna; conservare le QIAamp MinElute Column a 2–8°C



Annotare la data corrente dopo aver aggiunto etanolo al flacone

ADD

Aggiunta

Simbolo	Definizione del simbolo
LYOPH	Liofilizzato
RCNS	Ricostituito in
EtOH	Etanolo
GuHCl	Guanidina cloridrato
MALEIC ACID	Acido maleico
SUBT	Subtilisina
➔	Porta a
UDI	UDI (identificatore univoco del dispositivo)

Appendice

Trattamento dell'RNA

Le ribonucleasi (RNasi) sono enzimi molto stabili e attivi che non necessitano normalmente di cofattori per espletare la loro funzione. Dato che le RNasi sono difficilmente inattivabili e dato che sono sufficienti in piccolissime quantità per distruggere l'RNA, si raccomanda di non utilizzare plastica e vetreria da laboratorio senza aver prima eliminato una possibile contaminazione da RNasi. Prestare particolare attenzione allo scopo di evitare di introdurre inavvertitamente RNasi nel campione di RNA durante o dopo la procedura di purificazione. Per creare e mantenere un ambiente esente da RNasi, mentre si lavora con l'RNA adottare le seguenti precauzioni durante il pretrattamento e l'uso di recipienti monouso e riutilizzabili e di soluzioni.

Raccomandazioni generali per il trattamento

Adottare sempre una corretta tecnica di asepsi microbiologica quando si opera con l'RNA. Le mani e le particelle di polvere possono essere vettori di batteri e muffe e sono la fonte più comune di contaminazione da RNasi. Indossare sempre guanti in lattice o vinile quando si manipolano i reagenti e i campioni di RNA, per evitare la contaminazione da RNasi dovuta alla superficie della pelle o alla polvere delle attrezzature di laboratorio. Cambiare spesso i guanti e tenere chiuse le provette.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Indice	N. cat.
QIAamp DSP Virus Kit (50)	Per 50 preparazioni: QIAamp MinElute Column, tamponi, reagenti, provette, tubi di estensione, VacConnector	60704
Accessori		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold	Collettore da vuoto per processare 1–24 colonne spin: Collettore da vuoto QIAvac 24 Plus, tappi luer, raccordi rapidi	19413
Vacuum Pump	Pompa da vuoto universale	84020
VacConnectors	500 connettori monouso da utilizzare con QIAamp Spin Column su connettori luer	19407
VacValves	24 valvole da utilizzare con QIAvac 24 e QIAvac 24 Plus	19408
Vacuum Regulator	Vacuum Regulator	19530
QIAvac Connecting System	Sistema per collegare il collettore da vuoto con la pompa da vuoto: include vassoio, flaconi per rifiuti, tubi, raccordi, valvole, manometri e 24 VacValves	19419

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti consultare le Istruzioni per l'uso del rispettivo kit QIAGEN. Le Istruzioni per l'uso dei kit QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richieste ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

Cronologia delle revisioni del documento

Revisione	Descrizione
R1, giugno 2022	<p>Versione 2, revisione 1</p> <ul style="list-style-type: none">● Aggiornamento alla versione 2 del kit per la conformità a IVDR● Aggiornamento dei capitoli "Usò previsto" e "Limitazioni"● Aggiornamento di "Descrizione e principio"● Aggiornamento di "Materiali necessari ma non in dotazione" (aggiunta dei principi attivi) e del "Materiale necessario ma non in dotazione"● Aggiornamento delle "Avvertenze e precauzioni" (aggiunta di informazioni sulle emergenze e del capitolo "Smaltimento")● Aggiornamento di "Conservazione e manipolazione dei reagenti"● Aggiornamento di "Prelievo, conservazione e trasporto dei campioni"● Aggiornamento di note e procedure importanti● Aggiornamento delle "Caratteristiche delle prestazioni"● Aggiunta del capitolo "Appendice"● Aggiunta della Guida alla risoluzione dei problemi● Aggiornamento del capitolo "Simboli"● Aggiunta delle "Informazioni sugli ordini"

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Contratto di licenza limitata per il QIAamp® DSP Virus Kit

L'uso di questo prodotto implica l'accordo di qualsiasi acquirente o utente del prodotto ai seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e alle presenti Istruzioni per l'uso e soltanto con i componenti contenuti nel pannello. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo pannello con qualsiasi componente non incluso in questo pannello, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, le presenti Istruzioni per l'uso e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. Al di fuori delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non garantisce che questo pannello e/o il suo utilizzo non violino i diritti di terzi.
3. Questo pannello e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del pannello accettano di non prendere o permettere a chiunque altro di prendere misure che potrebbero portare o facilitare qualsiasi atto vietato sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo pannello e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group). I marchi registrati, di fabbrica e così via utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, devono essere considerati come protetti dalla legge.

11275411T 06/2022 HB-3032-001 © 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Ordini www.qiagen.com/shop | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com