

Augustus 2018

Handleiding QIAamp[®] DSP Virus-kit



De QIAamp DSP Virus-kit is een generiek systeem dat gebruikmaakt van QIAamp-technologie voor isolatie en zuivering van virale nucleïnezuuren uit humaan plasma of serummonsters voor in-vitrodiagnostische procedures.

Voor in-vitrodiagnostiek

IVD

CE

REF

60704



1114514NL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DUITSLAND

EC REP



R3 MAT

1024585

Inhoudsopgave

Inhoud van de kit	3
Symbolen	4
Opslag	5
Kwaliteitscontrole	5
Beoogd gebruik	5
Beperkingen van het gebruik van het product	6
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	6
Inleiding	9
Principe en procedure	12
Apparatuur en reagentia die door de gebruiker moeten worden geleverd	15
Belangrijke opmerkingen	16
Wat u moet weten voor u begint	16
RNA bereiden	17
Opslag van monsters	17
Reagentia en buffers bereiden	17
Virale nucleïnezuuren elueren	20
Opbrengst en kwaliteit van virale nucleïnezuuren	21
Het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem instellen	21
Protocol: Isolatie en zuivering van virale nucleïnezuuren uit plasma en serum	24
Revisiegeschiedenis	29

Inhoud van de kit












QIAamp DSP Virus Kit				
Catalogusnr.				60704
Aantal preparaten				50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (QIAamp MinElute-kolommen met wasbuisjes) (WT) (2 ml)	COL		50
EXT	Column Extenders (Kolomverlengers (3 ml))	COL	EXT	50
ET	Elution Tubes (Elutiebuisjes (1,5 ml))	ELU	TUBE	50
VC	VacConnectors (Vacuümaansluitingen)	VAC	CON	50
LT	Lysis Tubes (Lysebuisjes (2 ml))	LYS	TUBE	50
WT	Wash Tubes (Wasbuisjes (2 ml))	WASH	TUBE	50
AL	Lysis Buffer (Lysebuffer)*	LYS	BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1 (concentrate) (Wasbuffer 1 (concentraat))*	WASH	BUF 1 CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (concentrate) (Wasbuffer 2 (concentraat))†	WASH	BUF 2 CON	13 ml
AVE	Elution Buffer (purple caps) (Elutiebuisjes (paarse dopjes))‡	ELU	BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent (Proteasesolvent)‡	QPROT	SOLV	4,4 ml
Drager	Carrier RNA (red caps) (Drager-RNA (rode dopjes))	CAR	RNA	310
QP	QIAGEN®-protease	QPROT	1 flacon	
CD				1
Handleiding				1

* Bevat guanidinehydrochloride. Niet geschikt voor gebruik met bleekhoudende desinfectiemiddelen. Zie pagina 6 voor veiligheidsinformatie.

† Bevat natriumazide als conserveermiddel.

‡ Resuspensievolume 4,4 ml.

Symbolen

	Kit bevat reagentia voor 50 monsterpreparaten
	Raadpleeg de informatie in de handleiding
	Houdbaar tot
IVD	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
REF	Catalogusnummer
LOT	Partijnummer
MAT	Materiaalnummer
COMP	Onderdelen
VOL	Volume
	Temperatuurlimieten
	Bij aankomst
	Wettelijke fabrikant
	Belangrijke opmerking
	Trek nieuwe handschoenen aan na een protocolstap met deze markering
	Openen bij levering; QIAamp Mini Spin-kolommen bewaren bij 2-8 °C
GTIN	Artikelnummer wereldhandel
	Schrijf na toevoeging van ethanol aan het flesje de huidige datum op
ADD	Toevoegen
CONT	Bevat
LYOPH	Gelyofiliseerd
RCNS	Reconstitueren in
EtOH	Ethanol
GuHCl	Guanidinehydrochloride
MALEIC ACID	Maleïnezuur
SUBT	Subtilisine
	Leidt naar

Opslag

QIAamp MinElute-kolommen moeten bij aankomst worden bewaard bij 2–8 °C.

Alle buffers kunnen worden bewaard bij kamertemperatuur (15–25 °C).

Gelyofiliseerd drager-RNA kan tot de uiterste houdbaarheidsdatum worden bewaard bij kamertemperatuur. Drager-RNA kan alleen worden opgelost in elutiebuffer (AVE); opgelost drager-RNA moet onmiddellijk worden toegevoegd aan lysebuffer (AL), zoals beschreven op pagina 17. Deze oplossing moet vers worden bereid en is maximaal 48 uur stabiel bij 2–8 °C. Ongebruikte porties drager-RNA die zijn opgelost in elutiebuffer (AVE) moeten worden bevroren in aliquots bij -20 °C.

Gelyofiliseerd QIAGEN-protease (QP) kan tot de uiterste houdbaarheidsdatum worden bewaard bij kamertemperatuur zonder dat de werking vermindert.

Gereconstitueerde QIAGEN-protease (QP) is maximaal 1 jaar stabiel bij een temperatuur van 2–8 °C, mits niet langer bewaard dan de uiterste houdbaarheidsdatum.

Gereconstitueerde wasbuffer 1 (AW1) en gereconstitueerde wasbuffer 2 (AW2) zijn maximaal 1 jaar stabiel bij kamertemperatuur, mits niet langer bewaard dan de uiterste houdbaarheidsdatum.

Kwaliteitscontrole

Elke partij QIAamp DSP Virus-kits wordt, in overeenstemming met het gecertificeerde totaal kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN, getest op vooraf vastgestelde specificaties om een consistente kwaliteit van het product te waarborgen.

Beoogd gebruik

De QIAamp DSP Virus-kit is een generiek systeem dat gebruikmaakt van QIAamp-technologie voor isolatie en zuivering van virale nucleïnezuuren uit humaan plasma of serummonsters voor in-vitrodiagnostiek. Gegenereerde diagnostische resultaten waarvan de monsterbereidingsprocedure gepaard ging met diagnostische NAT-vervolgassays moeten in samenhang met overige klinische bevindingen of laboratoriumresultaten worden geïnterpreteerd.

Dit product is bedoeld voor toepassing door professionele gebruikers, zoals analisten en artsen die zijn opgeleid in moleculair-biologische technieken. Het is ontworpen voor gebruik met vervolgaplicaties waarbij enzymatische amplificatie of andere enzymatische modificatie van DNA of RNA gevolgd door signaaldetectie of amplificatie in gang wordt gezet. De geïsoleerde en gezuiverde virale nucleïnezuuren kunnen voor zowel kwalitatieve (bijv. bloedonderzoek) als kwantitatieve (bijv. monitoren van de virale belasting) diagnostische NAT-assays worden gebruikt.

Om onregelmatigheden in de diagnostische resultaten te minimaliseren, kunt u dit product tijdens het monstervoorbereidingsproces combineren met zowel een interne controle als positieve en negatieve controles, en met amplificatie en detectie van monsters in overeenstemming met de gebruikte vervolgassays.

Dit product is bedoeld voor gebruik met het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem of een vergelijkbaar vacuümsysteem.

Beperkingen van het gebruik van het product

De kit is niet geschikt om te worden gebruikt met bloed, weefsel, beenmerg of gekweekte cellen. De kit is ook niet geschikt voor het isoleren en zuiveren van bacteriële, fungale of parasitaire nucleïnezuuren. De prestaties van de kit bij het isoleren en zuiveren van virale nucleïnezuuren uit andere celvrije lichaamsvloeistoffen, zoals urine en CSF, is niet beoordeeld.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg de bijbehorende veiligheidsinformatiebladen voor meer informatie (safety data sheets, SDS's). Deze zijn online beschikbaar in handig en compact pdf-formaat via www.qiagen.com/safety. Hier kunt u de SDS's van alle kits en kitcomponenten van QIAGEN vinden, bekijken en afdrukken.

LET OP: Voeg geen bleekmiddel of zuuroplossingen toe aan het afval van monsterbereiding.

Lysebuffer (AL) en wasbuffer 1 (AW1) bevatten guanidinehydrochloride, dat sterk reactieve verbindingen kan vormen met bleekwater. Gemorste vloeistof die deze

buffer bevat, moet worden opgenomen met een geschikt laboratoriumdetergens en water. Als de gemorste vloeistof mogelijk besmettelijke stoffen bevat, moet de verontreinigde plaats eerst worden gereinigd met laboratoriumdetergens en water, en vervolgens met 1% (v/v) natriumhypochloriet.

Draag bij het afvoeren van beschadigde of lekkende bufferflessen handschoenen en een veiligheidsbril om persoonlijk letsel of letsel bij anderen te voorkomen.

QIAGEN heeft het vloeistofafval dat bij de QIAamp DSP Virus-procedure voor overgebleven besmet materiaal wordt gevormd niet getest. Contaminatie van het vloeistofafval met overgebleven besmet materiaal is hoogst onwaarschijnlijk, maar kan niet worden uitgesloten. Om die reden moet vloeistofafval worden behandeld als besmettelijk en worden afgevoerd in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsbepalingen.

De volgende gevarenaanduidingen en voorzorgsmaatregelen zijn van toepassing op de onderdelen van de QIAamp DSP Virus-kit.

Buffer AL



Bevat: guanidinehydrochloride; maleïnezuur. Waarschuwing! Kan schadelijk zijn bij inslikken en bij inademing. Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Kan een allergische huidreactie veroorzaken. Bij aanhoudende oogirritatie: medische hulp inschakelen. Trek verontreinigde kleding uit en was deze voordat u de kleding opnieuw gebruikt. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gezichtsbescherming.

Buffer AW1



Bevat: guanidinehydrochloride. Waarschuwing! Schadelijk bij inslikken en bij inademing. Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Neem contact op met een GIFICENTRUM of een arts wanneer u onwel wordt. Voer de inhoud/container af naar een goedgekeurde afvalverwijderingsinstallatie. Trek verontreinigde kleding uit en was deze voordat u de kleding opnieuw gebruikt. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gezichtsbescherming.

QIAGEN-protease



Bevat: subtilisine. Gevaar! Veroorzaakt lichte huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogschade. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Voorkom inademing van stof/rook/gas/damp/stoom/spray. Voer de inhoud/container af naar een goedgekeurde afvalverwijderingsinstallatie. Bij ademhalingsymptomen: neem contact op met een GIFCENTRUM of arts. BIJ CONTACT MET DE OGEN: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten. Verwijder eventueel en indien mogelijk contactlenzen. Blijf spoelen. NA INADEMING: Breng het slachtoffer bij ademhalingsmoeilijkheden in de frisse lucht en laat het slachtoffer een comfortabele houding aannemen die het ademen vergemakkelijkt. Neem onmiddellijk contact op met een GIFCENTRUM of arts. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gezichtsbescherming. Draag ademhalingsbescherming.

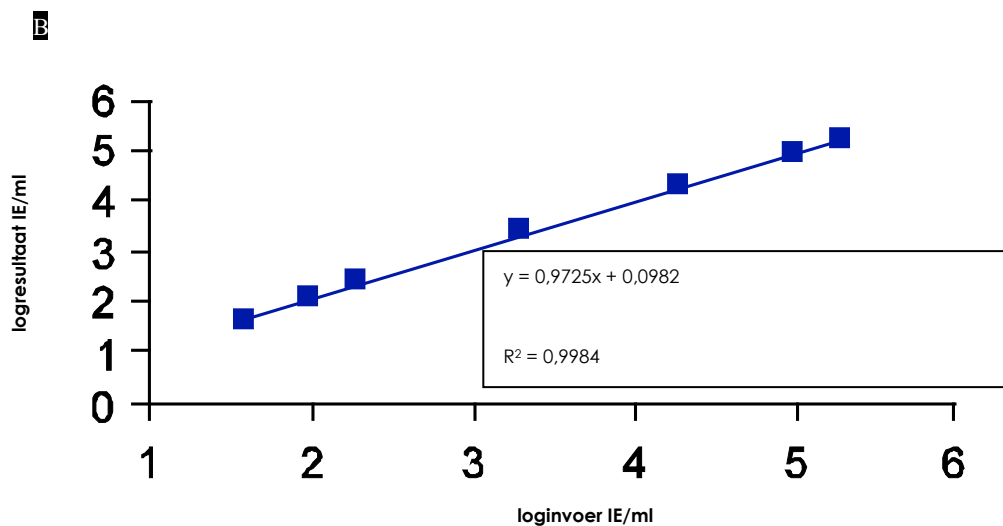
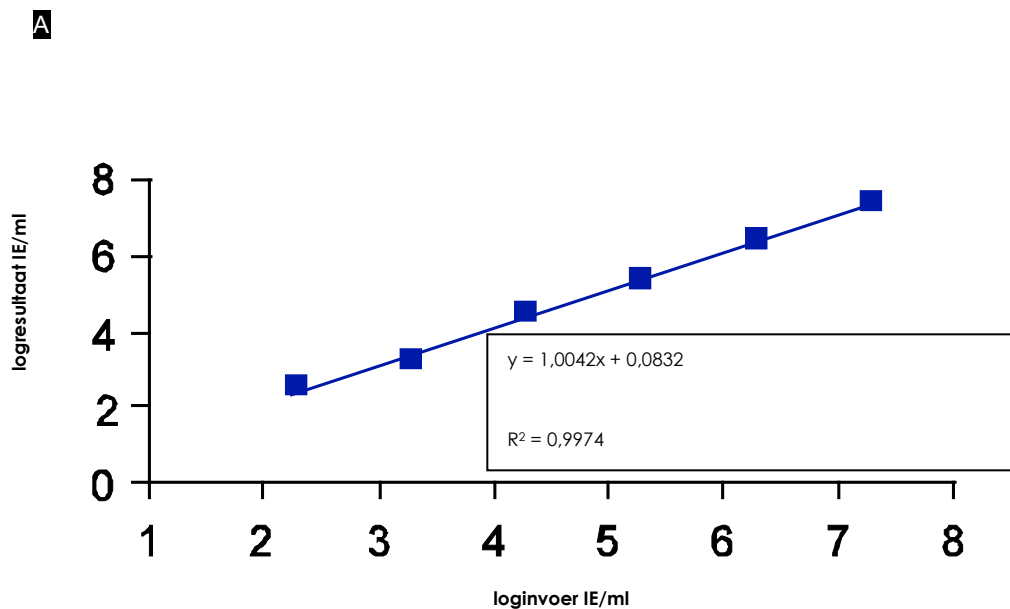
Inleiding

De QIAamp DSP Virus-kit maakt gebruik van gerenommeerde technologie voor gelijktijdige isolatie en zuivering van viraal DNA en RNA. De QIAamp DSP Virus-procedure combineert de selectieve bindingseigenschappen van een silicamembraan met minimale elutievolumes van 20 µl of 60 µl.

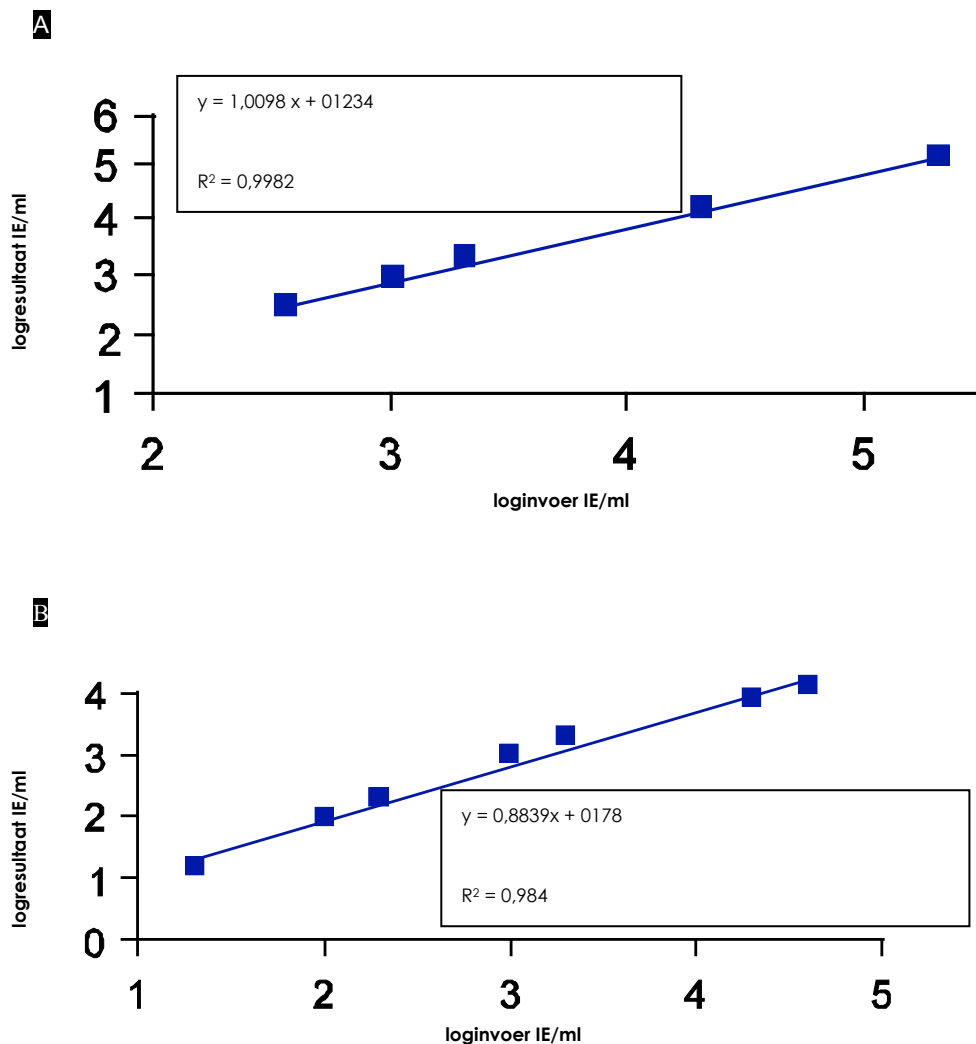
Het lineaire bereik van de QIAamp DSP Virus-procedure is vastgesteld voor HIV-RNA en HBV-DNA bij verschillende diagnostische vervolgassays (Tabel 1, Afbeelding 1 en Afbeelding 2).

Tabel 1.-Diagnostische vervolgassays waarmee het lineaire bereik van de QIAamp DSP Virus-procedure is getest

Assay	Kit
Realtime RT-PCR van HIV-RNA	TaqMan®-assay en cobas® AMPLICOR HIV-1 MONITOR®-test
Realtime PCR van HBV-DNA	TaqMan-assay en cobas AMPLICOR HBV MONITOR®-test



Afbeelding 1. Lineair bereik van de QIAamp DSP Virus-procedure bij gebruik van TaqMan-assays. Het lineaire bereik van de QIAamp DSP Virus-procedure bij een elutievolume van 60 µl is vastgesteld met behulp van TaqMan-assays voor **A** HIV-RNA en **B** HBV-DNA.



Afbeelding 2. Lineair bereik van de QIAamp DSP Virus-procedure bij gebruik van cobas AMPLICOR MONITOR-tests. Het lineaire bereik van de QIAamp DSP Virus-procedure bij een elutievolume van 60 µl is vastgesteld met behulp van cobas AMPLICOR MONITOR-tests voor **A** HIV-RNA en **B** HBV-DNA.

De procedure is geschikt voor gebruik met plasma of serum; beide kunnen citraat of EDTA bevatten. Monsters kunnen vers, gelyofiliseerd of bevroren zijn, mits zij niet vaker dan een keer zijn bevroren en ontdooid. De procedure kan worden gebruikt voor isolatie van viraal RNA en DNA uit een groot aantal RNA- en DNA-virussen. De procedure is ontwikkeld om kruiscontaminatie te voorkomen en voor veilige hantering van mogelijk besmettelijke monsters. De procedure is zeer geschikt voor het gelijktijdig verwerken van meerdere monsters. Virale nucleïnezuuren zijn geëluëerd in elutiebuffer (AVE) en zijn klaar voor gebruik in amplificatiereacties of opslag bij -20 °C.

Principe en procedure

De QIAamp DSP Virus-procedure bestaat uit 4 stappen:

- De virusdeeltjes in het monster lyseren
- De virale nucleïnezuren in het lysaat binden aan het membraan van een QIAamp MinElute-kolom
- Het membraan wassen
- De virale nucleïnezuren uit het membraan elueren

De procedure wordt uitgevoerd met behulp van QIAamp MinElute-kolommen op een vacuüm verdeelstuk.

Monstervolume

De detectielimiet (DL) en kwantificatielimiet (quantification limit, QL), conform IHC-richtlijnen 2QA en 2QB, zijn voor de QIAamp DSP Virus-procedure vastgesteld door middel van diverse diagnostische vervolgassays (met een uitgangsmonstervolume van 500 µl en elutievolumes van 20 µl en 60 µl) (Tabel 2 en Tabel 3).

Tabel 2.-Detectielimiet van de QIAamp DSP Virus-procedure

Assay	Elutievolume	Grenswaarde van 95%
artus® RealArt™-HBV-DNA	20 µl	2,31 IE/ml (n=240)
artus RealArt-HCV-RNA	20 µl	24,31 IE/ml (n=192)
AMPLICOR handmatig HIV-RNA	60 µl	90,92 IE/ml (n=209)
TaqMan-HBV-DNA	60 µl	4,73 IE/ml (n=192)

Tabel 3.-Kwantificatielimiet van de QIAamp DSP Virus-procedure

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

Virusdeeltjes lyseren

De monsters zijn gelyseerd onder denaturerende omstandigheden bij verhoogde temperaturen. Lyse wordt uitgevoerd in de aanwezigheid van QIAGEN-protease (QP) en lysebuffer (AL), die samen zorgen voor de inactivering van RNasen.

Nucleïnezuren aan het membraan van de QIAamp MinElute-kolom binden

Om de binding van viraal DNA en RNA aan het membraan van de QIAamp MinElute-kolom te optimaliseren, wordt er eerst ethanol aan de lysaten toegevoegd. Vervolgens wordt ieder lysaat aangebracht op een QIAamp MinElute-kolom en loopt het lysaat er met behulp van vacuümdruk doorheen, zodat de virale nucleïnezuren worden geadsorbeerd aan het silicagelmembraan.

Achtergebleven contaminanten verwijderen

Terwijl de virale nucleïnezuren gebonden blijven aan het membraan van de QIAamp MinElute-kolom, worden contaminanten eerst efficiënt weggespoeld met behulp van wasbuffer 1 (AW1), vervolgens met wasbuffer 2 (AW2) en daarna met ethanol.

Zuivere nucleïnezuren elueren

Virale nucleïnezuren worden geëluëerd van het membraan van de QIAamp MinElute-kolom met behulp van elutiebuffer (AVE). De QIAamp MinElute-kolommen zijn geschikt voor elutievolumes van 20 µl of 60 µl.

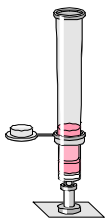
Afhankelijk van de gebruikte vervolgassay kan het nucleïnezuureluaat tot 50% van het reactievolume bevatten zonder dat de werking wordt geremd.

QIAamp DSP Virus -procedure

Monster

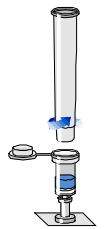


Lyseren



Binden

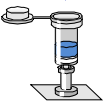
Vacumeren



Wassen
(AW1)

Verwijder de EXT
voordat het
vacuüm wordt
toegepast.

Vacumeren



Wassen
(AW2)

Vacumeren



Wassen
(Ethanol)

Vacumeren



Droogcent-
rifuger

Elueren



Viraal nucleïnezuur

Lees het protocol (pagina 24) zorgvuldig voordat u begint

Vul een lysebuisje (LT) met 75 µl QP, 500 µl monster en 500 µl AL.

Vortex gedurende 15 sec.

Incubeer gedurende 15 min (± 1 min) bij 56 °C (± 1 °C).

Voeg 600 µl ethanol toe.

Vortex gedurende 15 sec.

Incubeer gedurende 5 min (± 1 min) bij kamertemperatuur (15–25 °C).

Breng het lysaat over naar de QIAamp MinElute-kolom met geplaatste EXT.

Voeg 600 µl gereconstitueerd AW1 toe.

Verwijder de EXT.

Voeg 700 µl gereconstitueerd AW2 toe.

Voeg 750 µl ethanol toe.

Plaats de QIAamp MinElute-kolom in WT.

Centrifugeer 1 min met 14.000 tpm.

Plaats de QIAamp MinElute-kolom in WT.

Incubeer gedurende 3 min bij 56 °C.

Plaats de QIAamp MinElute-kolom in ET.

Voeg 20 µl of 60 µl AVE toe.

Incubeer gedurende 3 min bij kamertemperatuur.

Centrifugeer 1 min met 14.000 tpm.

Apparatuur en reagentia die door de gebruiker moeten worden geleverd

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de betreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB of MSDS) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

- Ethanol (96–100%)
- Pipetten* en pipetpuntjes (om kruiscontaminatie te voorkomen adviseren wij dringend gebruik te maken van pipetpuntjes met aerosolfilter)
- Wegwerphandschoenen
- Verwarmingsblok* voor het lyseren van monsters bij 56 °C (wij adviseren de Eppendorf® Comfort-thermomixer met thermoblok voor microtestbuisjes van 2,0 ml[†]).
- Microcentrifuge*
- Meetcilinder (50 ml)
- Vortex
- QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem[‡] (QIAvac 24 Plus, cat.nr. 19413, QIAvac-verbindingssysteem, cat.nr. 19419 en vacuümpomp, cat.nr. 84020[§]), of een vergelijkbaar algemeen laboratoriumvacuümsysteem.

* Om te zorgen voor een goede verwerking van monsters tijdens de procedures met de QIAamp DSP Virus-procedure adviseren wij dringend alle instrumenten (zoals pipetten en verwarmingsblokken) te kalibreren volgens de aanbevelingen van de fabrikanten.


[†] Dit is geen volledige lijst van leveranciers; veel belangrijke leveranciers van biotechnologische artikelen zijn niet in deze lijst opgenomen.

[‡] Beschikbaar vanaf medio 2004; zie www.qiagen.com/products/accessories.

[§] Het cat.nr. 84020 verwijst naar een pomp die geschikt is voor Europese landen (bijv. Duitsland). Neem contact op met QIAGEN voor informatie over landen met andere vereisten op het gebied van spanning of stekkers.

Belangrijke opmerkingen

Wat u moet weten voor u begint

- Controleer de onderdelen van de kit na ontvangst op beschadigingen. Neem in geval van beschadiging van de doordrukverpakkingen of de flesjes met buffer contact op met de technische dienst van QIAGEN of uw plaatselijke distributeur. Raadpleeg 'Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen' in geval van gemorste vloeistof (pagina 6).
- Gebruik geen onderdelen van de kit die beschadigd zijn, door het gebruik hiervan is de kit mogelijk minder effectief.
- Gebruik altijd RNase-vrije apparatuur.
- Bewaar ethanol (96–100%) tijdens de procedure op ijs.
- Gebruik na het overbrengen van ieder volume vloeistof steeds een nieuwe pipetpunt. Wij adviseren gebruik te maken van pipetpunten met aerosolfilter om kruiscontaminatie te voorkomen.
- Alle centrifugatiestappen worden uitgevoerd bij kamertemperatuur (15–25 °C).
- Draag altijd wegwerphandschoenen en controleer regelmatig of deze niet zijn besmet met materiaal uit een monster.
- Gooi handschoenen weg bij contaminatie en na ten minste alle stappen die zijn gemarkeerd met het handschoensymbool. 
- Open niet meer dan één buisje tegelijk om kruiscontaminatie te voorkomen.
- Gebruik geen onderdelen uit andere kits met de kit die u op dit moment gebruikt, tenzij de partijnummers identiek zijn.
- Voorkom microbiële contaminatie van de reagentia uit de kit.
- Ter bescherming tegen mogelijk besmettelijk materiaal adviseren wij om te werken in een laminaire luchtstroomkast totdat de monsters zijn gelyseerd.
- Deze kit mag alleen worden gebruikt door mensen die zijn opgeleid in laboratoriumwerkwijzen voor in-vitrodiagnostiek.
- De procedure bevat instructies voor het verwerken van één plasma- of serummonster. Met het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem kunnen echter 24 monsters tegelijkertijd worden verwerkt.

RNA bereiden

Werk snel tijdens de handmatige stappen van de procedure bij het bereiden van viraal RNA.

Elutiebuffer (AVE) bevat natriumazide*, een antimicrobiële stof die de groei van RNase-producerende organismen tegengaat. Omdat deze buffer echter geen RNase-remmende chemicaliën bevat, worden RNasen die door onzorgvuldig handelen in de buffer terechtkomen niet actief afgebroken. Wees uiterst voorzichtig bij het werken met elutiebuffer (AVE) om contaminatie met RNasen te voorkomen.

Opslag van monsters

Na verzameling en centrifugatie, kan plasma of serum maximaal 6 uur worden bewaard bij 2–8 °C. Voor langdurige opslag wordt aanbevolen om de monsters te verdelen in aliquots en in te vriezen bij -20 °C of -80 °C. Bevroren plasma- of serummonsters mogen niet vaker dan één keer worden ontdooid. Herhaaldelijk invriezen en ontdooien leidt tot denaturatie en precipitatie van eiwitten, wat resulteert in verlaagde virale titers en daarmee verminderde opbrengsten van virale nucleïnezuren. Daarnaast raakt het membraan van de QIAamp MinElute-kolom verstopt door cryoprecipitaten die worden gevormd tijdens het proces van invriezen en ontdooien. Zichtbare cryoprecipitaten moeten worden gepelletiseerd door centrifugatie met ongeveer 6800 x g gedurende 3 minuten. De opgeschoonde supernatant moet onmiddellijk worden geaspireerd en verwerkt, zonder dat de pellet wordt verstoord.

Reagentia en buffers bereiden

QIAGEN-protease bereiden

Voeg de gehele inhoud van de flacon met 4,4 ml proteaseoplosmiddel (PS) toe aan de flacon met gelyofiliseerde QIAGEN-protease (QP) en meng de inhoud voorzichtig. Meng de inhoud door de flacon meerdere keren om te draaien om te voorkomen dat het mengsel gaat schuimen. Zorg ervoor dat de QIAGEN-protease (QP) volledig wordt opgelost.



Voeg QIAGEN-protease (QP) niet rechtstreeks toe aan lysebuffer (AL).

* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril.

Toevoegen van drager-RNA en interne controle aan lysebuffer

Drager-RNA dient twee doeleinden. Ten eerste verbetert het de binding van virale nucleïnezuren aan het membraan van de QIAamp MinElute-kolom, vooral wanneer het monster zeer weinig doelmoleculen bevat. Ten tweede vermindert de toevoeging van grote hoeveelheden drager-RNA de kans op afbraak van viraal RNA, in het zeldzame geval dat RNasemoleculen niet zijn gedenateerd door de chaotrope zouten en detergens in lysebuffer (AL). Als er geen drager-RNA wordt toegevoegd aan lysebuffer, kan dit leiden tot verminderde winning van viraal RNA of DNA.

Drager-RNA kan ook worden toegevoegd aan sommige reagentia voor interne controle of in de handel verkrijgbare vervolgassays. Raadpleeg in dergelijke gevallen de bijbehorende gebruiksaanwijzing van de fabrikant of vervolgassay.

Het gebruik van een interne controle wordt sterk aanbevolen wanneer de QIAamp DSP Virus-kit wordt gebruikt in combinatie met diagnostische amplificatiesystemen. RNA of DNA voor interne controle en gereconstitueerd drager-RNA moeten worden toegevoegd aan lysebuffer (AL) en grondig worden gemengd door het buisje 10 keer om te draaien. Schud de inhoud niet om schuimen te voorkomen.

Raadpleeg de instructies van de fabrikant om de meest geschikte concentratie interne controle te bepalen. Het gebruik van een andere concentratie dan aanbevolen, leidt mogelijk tot onjuiste resultaten. Houd bij het berekenen van de juiste hoeveelheid interne controle rekening met het uitgangsvolume van het monster en het elutievolume. De QIAamp DSP Virus-kit gebruikt een uitgangsmonstervolume van 500 µl.

Vul het buisje dat 310 µg gelyofiliseerd drager-RNA bevat met 310 µl elutiebuffer (AVE) om een oplossing drager-RNA van 1 µg/µl te bereiden. Los het drager-RNA geheel op, verdeel de oplossing in handzame aliquots en bewaar deze bij -20 °C. Ontdooi de ingevroren aliquots drager-RNA niet vaker dan 2 keer.

Drager-RNA lost niet op in lysebuffer (AL). Drager-RNA moet eerst worden opgelost in elutiebuffer (AVE) en kan daarna worden toegevoegd aan lysebuffer (AL). Controleer of het drager-RNA volledig is opgelost in de juiste hoeveelheid elutiebuffer (AVE), voordat het wordt gemengd met lysebuffer (AL).



Gebruik altijd de juiste interne controle voor de vervolgassay. Raadpleeg de instructies van de fabrikant voor meer informatie.

Bereken het volume van het mengsel met lysebuffer (AL)/drager-RNA dat nodig is per batch monsters door in Tabel 4 het aantal monsters te selecteren dat gelijktijdig moet worden verwerkt. Volumes kunnen worden berekend met behulp van de volgende monsterberekening:

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

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

waar: n = aantal monsters dat gelijktijdig moet worden verwerkt

y = berekend volume lysebuffer (AL)

z = volume drager-RNA/elutiebuffer (AVE) dat aan de lysebuffer (AL) moet worden toegevoegd

Tabel 4.-Vereiste volumes lysebuffer (AL) en drager-RNA/elutiebuffer (AVE) voor de QIAamp DSP Virus-procedure

Aantal monsters	Vol. AL (ml)	Vol. drager-RNA/AVE (μ l)	Aantal monsters	Vol. AL (ml)	Vol. drager-RNA/AVE (μ l)
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

Wasbuffer 1 bereiden

Voeg met behulp van een maatcilinder 25 ml ethanol (96–100%) toe aan de fles met 19 ml wasbuffer 1-concentraat (AW1). Bewaar de gereconstitueerde wasbuffer 1 (AW1) bij kamertemperatuur (15–25 °C).



Meng de gereconstitueerde wasbuffer 1 (AW1) altijd door de fles meerdere keren om te draaien voordat u de procedure start.

Wasbuffer 2 bereiden

Voeg met behulp van een maatscilinder 30 ml ethanol (96–100%) toe aan de fles met 13 ml wasbuffer 2-concentraat (AW2). Bewaar de gereconstitueerde wasbuffer 2 (AW2) bij kamertemperatuur (15–25 °C).



Meng de gereconstitueerde wasbuffer 2 (AW2) altijd door de fles meerdere keren om te draaien voordat u de procedure start.

Elutiebuffer bereiden

De kit wordt geleverd met vier buisjes elutiebuffer (AVE). Let op dat u de buffer niet verontreinigt met RNasen. Wanneer met één kit vier zuiveringsprocedures of minder worden uitgevoerd, adviseren wij om het buisje elutiebuffer (AVE) aan het eind van iedere procedure weg te gooien.

Virale nucleïnezuren elueren

Voor vervolgbepalingen waarvoor een klein uitgangsvolume nodig is (bijv. sommige PCR- en RT-PCR-assays), kan het gebruik van virale nucleïnezuren die zijn geëluëerd in 20 µl elutiebuffer (AVE) de assaygevoeligheid verhogen.

Het volume van virale nucleïnezuren die zijn geëluëerd van een QIAamp MinElute-kolom kan tot 5 µl minder zijn dan het volume elutiebuffer (AVE) dat op de kolom is aangebracht. Het elueren van virale nucleïnezuren met 60 µl elutiebuffer (AVE) leidt bijvoorbeeld tot een eluaat van ongeveer 55 µl, terwijl elueren met 20 µl resulteert in ongeveer 15 µl eluaat.

Het volume van het eluaat dat wordt verkregen, is afhankelijk van de aard van het monster. Als het volume van het verkregen eluaat te laag is voor de vervolgassay, kan dit worden verhoogd door het toevoegen van meer elutiebuffer (AVE).

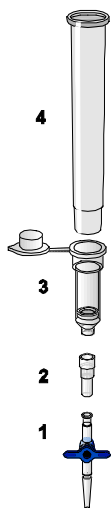
Geëluëerde virale nucleïnezuren worden verzameld in elutiebuisjes (ET). Als de virale nucleïnezuren maximaal 24 uur worden bewaard, adviseren wij om ze bij 2–8 °C te bewaren.

Opbrengst en kwaliteit van virale nucleïnezuren

De opbrengst en kwaliteit van de geïsoleerde virale nucleïnezuren zijn geschikt voor alle soorten vervolgdetectieprocedures van moleculaire diagnostiek. Diagnostische assays moeten worden uitgevoerd in overeenstemming met de aanwijzingen van de fabrikant.

Het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem instellen

Controleer of de kolomverlenger (EXT), QIAamp MinElute-kolom, vacuümaansluiting (VC) en het vacuümventiel goed zijn ingesteld (zie Afbeelding 3).



Afbeelding 3. Montage van de onderdelen van de QIAamp DSP Virus-kit voor de vacuüm verwerking van monsters:

1: Vacuümventiel (meegeleverd met het vacuümsysteem)

3: QIAamp MinElute-kolom

2: Vacuümaansluiting (VC)

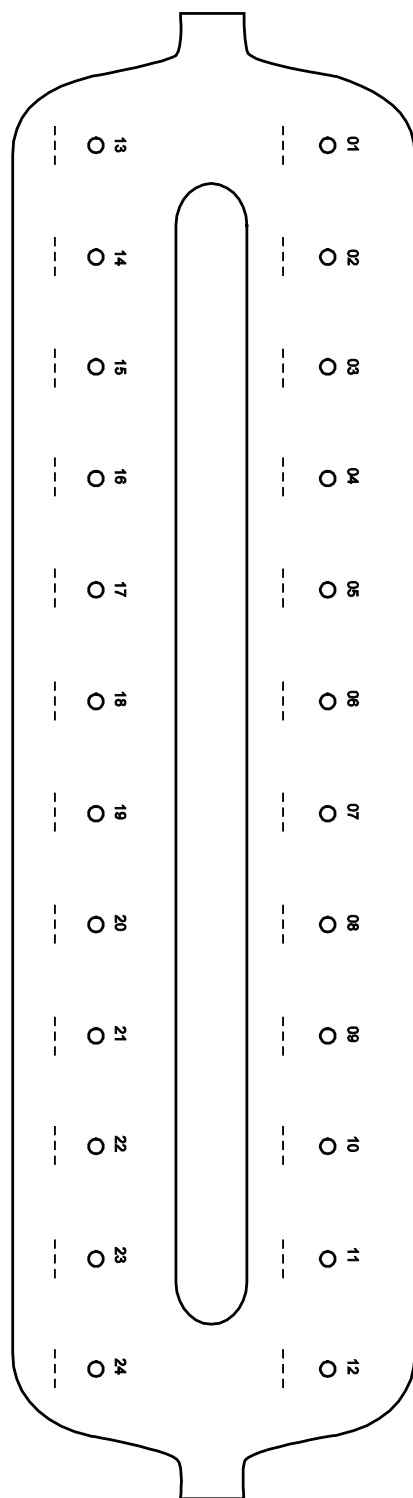
4: Kolomverlenger (EXT)

Wij adviseren om de lysebuisjes (LT), elutiebusjes (ET) en QIAamp MinElute-kolommen te etiketteren voor gebruik met het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem, conform het schema in Afbeelding 4 om het door elkaar halen van monsters te voorkomen. Deze afbeelding kan worden gekopieerd en worden voorzien van de namen van de monsters.

Datum: _____

Gebruiker: _____

Run-ID: _____



Afbeelding 4. Etiketteringsschema voor lysebuisjes (LT), elutiebuisjes (ET) en QIAamp MinElute-kolommen voor gebruik met het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem.

Protocol: Isolatie en zuivering van virale nucleïnezuuren uit plasma en serum

Voor isolatie en zuivering van virale nucleïnezuuren uit 500 µl met EDTA of citraat behandeld plasma en serum.

Wat u moet doen voor u begint

- Laat de monsters op kamertemperatuur komen (15–25 °C) en controleer of ze goed zijn gemengd.
- Voeg drager-RNA toe dat is gereconstitueerd in elutiebuffer (AVE) of interne controle toe aan lysebuffer (AL) volgens de instructies op pagina 17.
- Controleer of wasbuffer 1 (AW1), wasbuffer 2 (AW2) en QIAGEN-protease (QP) is bereid volgens de instructies in de paragraaf 'Belangrijke opmerkingen' op pagina 16.
- Laat de elutiebuffer (AVE) op kamertemperatuur komen (15–25 °C) voor gebruik in stap 18. Gebruik indien mogelijk voor iedere procedure nieuwe elutiebuffer (AVE) (er zijn 4 buisjes meegeleverd).
- Stel een verwarmingsblok in op 56 °C voor gebruik in stap 4 en 17.
- Plaats een vacuümaansluiting in iedere luer-adapter van het vacuümsysteem om kruiscontaminatie te voorkomen.
- Controleer of de afvalfles van het vacuümsysteem leeg is en of alle koppelingen correct zijn aangesloten.
- Raadpleeg de meegeleverde handleiding voor meer informatie over het vacuümsysteem, vooral op het gebied van onderhoud.

Procedure

1. Pipetteer 75 µl QIAGEN-protease (QP) in een lysebuisje (LT).



Controleer voor gebruik de vervaldatum van de gereconstitueerde protease.

2. Voeg 500 µl plasma of serum toe aan het lysebuisje (LT).
3. Voeg 500 µl lysebuffer (AL) (met 11,2 µg/ml drager-RNA) toe aan het lysebuisje (LT), sluit het dopje en meng de inhoud gedurende 15 seconden met een pulse-vortexmixer.

Voor efficiënte lyse is het essentieel dat het monster en de lysebuffer (AL) grondig worden gemengd tot een homogene oplossing.



Lysebuffer (AL) bevat interne controle. Aangezien lysebuffer (AL) een hoge viscositeit heeft, moet u ervoor zorgen dat u het juiste volume aan lysebuffer (AL) toevoegt door zorgvuldig te pipetteren of door een geschikte pipet te gebruiken, zoals een Eppendorf-meerstepsipet of een vergelijkbaar pipet.



Voeg QIAGEN-protease (QP) niet rechtstreeks toe aan lysebuffer (AL).

4. Incubeer bij 56 °C (±1 °C) gedurende 15 minuten (±1 min).
5. Centrifugeer het lysebuisje (LT) gedurende ≥5 seconden op volle snelheid om druppels aan de binnenkant van het dopje te verwijderen.



6. Trek nieuwe handschoenen aan en open het lysebuisje (LT) voorzichtig.
7. Voeg 600 µl ethanol (96–100%) toe aan het lysebuisje (LT), sluit het dopje en meng de inhoud grondig gedurende ≥15 seconden met een pulse-vortexmixer. Incubeer gedurende 5 (±1) minuten bij kamertemperatuur (15–25 °C).
8. Centrifugeer het lysebuisje (LT) gedurende ≥5 seconden op volle snelheid om druppels aan de binnenkant van het dopje te verwijderen.
9. Plaats de QIAamp MinElute-kolom in de vacuümaansluiting (VC) van het vacuümsysteem (zie Afbeelding 3, pagina 21). Plaats een kolomverlenger (EXT) in de geopende QIAamp MinElute-kolom.



Bewaar het wasbuisje (WT) voor het droogcentrifugeren in stap 16.



10. Trek nieuwe handschoenen aan en open niet meer dan één buisje tegelijk.
11. Breng het volledige lysaat van stap 7 over naar de kolomverlenger (EXT) van de QIAamp MinElute-kolom zonder de rand nat te maken. Raak het membraan van de QIAamp MinElute-kolom niet aan met de pipetpunt.
12. Schakel de vacuümpomp in. Wacht tot het lysaat door de QIAamp MinElute-kolom is gelopen, open het ventiel van het vacuümsysteem en hef het vacuüm op. Wanneer u verschillende QIAamp MinElute-kolommen tegelijkertijd verwerkt, adviseren wij om het vacuümventiel van iedere kolom te sluiten nadat het lysaat erdoorheen is gelopen om de duur van deze vacuümschap te verkorten.



Gooi de QIAamp MinElute-kolom weg en herhaal de procedure met een nieuw monster als het lysaat na 15 minuten niet volledig door het membraan is gelopen.



Het ventiel van het vacuümsysteem is bedoeld om de vacuümdruk snel op te heffen.

13. Breng 600 µl wasbuffer 1 (AW1) over naar de QIAamp MinElute-kolom. Verwijder de kolomverlenger (EXT), gooi deze weg en sluit het ventiel van het vacuümsysteem. Wacht tot de wasbuffer 1 (AW1) door de QIAamp MinElute-kolom is gelopen, open het ventiel en hef het vacuüm op.



Zorg ervoor dat verwijderde kolomverlengers (EXT) aangrenzende QIAamp MinElute-kolommen niet bovenlangs passeren om kruiscontaminatie te voorkomen.

14. Breng 750 µl wasbuffer 2 (AW2) over naar de QIAamp MinElute-kolom zonder de rand nat te maken. Raak het membraan van de QIAamp MinElute-kolom niet aan met de pipetpunt. Laat het dopje van de kolom geopend en sluit het ventiel van het vacuümsysteem. Wacht tot de wasbuffer 2 (AW2) door de QIAamp MinElute-kolom is gelopen, open het ventiel en hef het vacuüm op.
15. Breng 750 µl ethanol (96–100%) over naar de QIAamp MinElute-kolom zonder de rand nat te maken. Raak het membraan van de QIAamp MinElute-kolom niet aan met de pipetpunt. Laat het dopje van de kolom geopend en sluit het ventiel van het vacuümsysteem. Wacht tot de ethanol door de QIAamp MinElute-kolom is gelopen, open het ventiel en hef het vacuüm op.



Breng de ethanol met behulp van pipetpunten met aerosolfilter over naar de QIAamp MinElute-kolom.

16. Sluit het dopje van de QIAamp MinElute-kolom, verwijder de kolom van het vacuümsysteem en gooi de vacuüsaansluiting (VC) weg. Plaats de QIAamp MinElute-kolom in het bewaarde wasbuisje (WT) uit stap 9 en centrifugeer het wasbuisje op volle snelheid (ongeveer 20.000 x g, of 14.000 tpm) gedurende 1 minuut om het membraan volledig te drogen. Gooi het wasbuisje (WT) met het filtraat weg.



Nalaten van het droogcentrifugeren kan leiden tot verminderde werking van het vervolgassay.

17. Plaats de QIAamp MinElute-kolom in een nieuw wasbuisje (WT) en incubeer het buisje met het dopje geopend gedurende 3 minuten bij 56 °C om eventueel achtergebleven vloeistof te verdampen.
18. Plaats de QIAamp MinElute-kolom in een schoon elutiebuisje (ET) en gooi het wasbuisje (WT) weg. Open het dopje van de QIAamp MinElute-kolom voorzichtig en breng 20 µl of 60 µl elutiebuisje (AVE) (afhankelijk van het vervolgassay) over naar het midden van het membraan. Sluit het dopje en incubeer de kolom gedurende

≥3 minuten bij kamertemperatuur (15–25 °C). Centrifugeer op volle snelheid (ongeveer 20.000 x g, of 14.000 tpm) gedurende 1 minuut om de virale nucleïnezuren volledig te elueren.



Volg de onderhoudsprocedure voor het vacuümsysteem na het doorlopen van dit protocol (zie de meegeleverde handleiding van het vacuümsysteem voor meer informatie).

Zie de handleiding of gebruikershandleiding van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. Handleidingen van QIAGEN-kits en gebruikershandleidingen zijn beschikbaar via www.qiagen.com of kunnen worden opgevraagd bij de afdeling QIAGEN Technical Services of uw lokale QIAGEN-vestiging.

Revisiegeschiedenis

Documentrevisiegeschiedenis	
R4 08/2018	Voetnoot met uitleg over het cat.nr. van de vacuümpomp, zie pag. 15 Indeling van de handleiding bijgewerkt.

Beperkte licentieovereenkomst voor de XXXXX [productnaam invoegen]

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en mag alleen worden gebruikt met onderdelen die zich in de kit bevinden. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van deze kit te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij de kit zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.qiagen.com. Enkele van deze aanvullende protocollen zijn door QIAGEN-gebruikers geleverd aan QIAGEN-gebruikers. Deze protocollen zijn niet grondig door QIAGEN getest of geoptimaliseerd. QIAGEN garandeert deze protocollen niet en garandeert evenmin dat ze geen rechten van derden schenden.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen, en niemand anders toestaan stappen te ondernemen, die kunnen leiden tot enige handeling die hierboven als verboden is vermeld, of die dergelijke handelingen mogelijk maken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten verhalen, inclusief advocaatkosten, bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Zie www.qiagen.com voor bijgewerkte licentievoorwaarden.

Handelsmerken: QIAGEN®, QIAamp®, artus®, MinElute® (QIAGEN Group); AMPLICOR HBV MONITOR®, AMPLICOR HCV MONITOR®, AMPLICOR HIV-1 MONITOR®, cobas®, TaqMan® (Roche Group); RealArt™ (artus GmbH); Eppendorf® (Eppendorf AG). Gedeponeerde namen, handelsmerken, etc. die in dit document worden gebruikt, ook al zijn deze niet specifiek als zodanig aangeduid, mogen niet worden beschouwd als niet wettelijk beschermd.

Het PCR-proces valt onder de Amerikaanse octrooien 4,683,195 en 4,683,202 en de buitenlandse equivalenten die eigendom zijn van Hoffmann-La Roche AG.

1114514 08/2018 HB-0109-003 © 2018 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

Bestellen www.qiagen.com/shop | Technische ondersteuning support.qiagen.com | Website www.qiagen.com