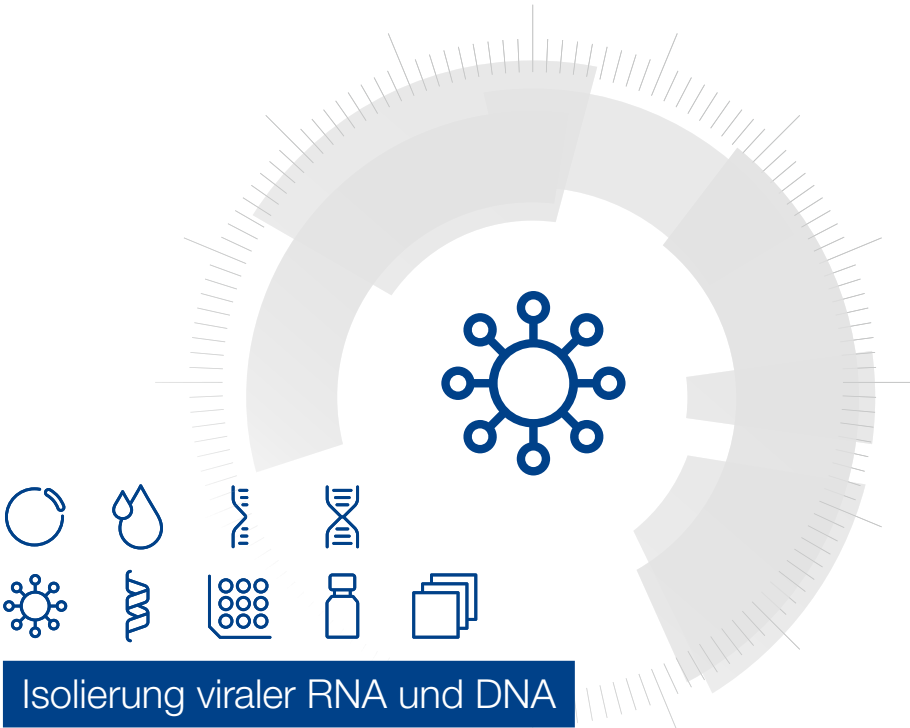


MACHEREY-NAGEL

Handbuch



Isolierung viraler RNA und DNA

■ NucleoMag® Dx Pathogen



IVD *In-vitro*-Diagnostikum

REF 744215.4

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciener Str. 11 · 52355 Düren · Deutschland

Σ 384 Präp.

i Juli 2025 / Rev. 04

Contact MN

Germany and international

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciener Str. 11 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-0
Toll-free: 0800 26 16 000 (Germany only)
E-mail: info@mn-net.com

Technical Support Bioanalysis

Tel.: +49 24 21 969-333
E-mail: support@mn-net.com

USA

MACHEREY-NAGEL Inc.
924 Marcon Blvd. · Suite 102 · Allentown PA, 18109 · USA
Toll-free: 888 321 6224 (MACH)
E-mail: sales-us@mn-net.com

France

MACHEREY-NAGEL SAS
1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerdt Cedex · France
Tel.: +33 388 68 22 68
E-mail: sales-fr@mn-net.com

MACHEREY-NAGEL SAS (Société par Actions Simplifiée) au capital de 186600 €
Siret 379 859 531 00020 · RCS Strasbourg B379859531 · N° intracommunautaire FR04 379 859 531

Switzerland


MACHEREY-NAGEL AG
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Switzerland
Tel.: +41 62 388 55 00
E-mail: sales-ch@mn-net.com

Inhaltsverzeichnis

1	Komponenten	4
1.1	Inhalt des Kits	4
1.2	Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	5
1.3	Informationen zu diesem Benutzerhandbuch	6
2	Produktbeschreibung	7
2.1	Bestimmungsgemäßer Gebrauch	7
2.2	Anwendungseinschränkungen des Produkts	7
2.3	Qualitätskontrolle	7
2.4	Das Grundprinzip	8
2.5	Kit-Spezifikationen	8
2.6	Probenqualität und -vorbereitung	9
2.7	Leistungsbewertung auf automatisierten Systemen	9
2.8	Elutionsverfahren	12
2.9	Analytische und klinische Leistungsfähigkeit	13
3	Lagerungsbedingungen und Zubereitung der Arbeitslösungen	15
4	Sicherheitshinweise	17
4.1	Entsorgung	17
5	Protokoll für die Isolierung von viraler RNA aus Abstrichen der menschlichen Atemwege und aus dem Speichel des Menschen sowie von viraler RNA und viraler DNA aus menschlichen Stuhlproben	18
5.1	Vorbereitung der Probenmaterialien	18
5.2	Übersichtsprotokoll	19
5.3	Detailliertes Protokoll	21
6	Anhang	24
6.1	Fehlerbehebung	24
6.2	Meldepflicht	25
6.3	Allgemeine Literatur	25
6.4	Informationen zur Bestellung	26
6.5	Erläuterung der Symbole	27
6.6	Nutzungseinschränkung des Produkts/Garantie	28

1 Komponenten

1.1 Inhalt des Kits

NucleoMag® Dx Pathogen		
REF	Symbol	4 × 96 Präp. 744215.4
NucleoMag® B-Beads	B-Beads	10 mL
Lysis Buffer NPL1	BUF NPL1	100 mL
Binding Buffer NPB2	BUF NPB2	3 × 110 mL
Wash Buffer NPW3	BUF NPW3	300 mL
Wash Buffer NPW4	BUF NPW4	300 mL
Elution Buffer NPE5	BUF NPE5	125 mL
Carrier RNA*	Carrier RNA	4 × 400 µg
Carrier RNA Buffer	Carrier RNA Buffer	4 × 500 µL
Proteinase K (lyophilized)*	Proteinase K	3 × 75 mg
Proteinase Buffer PB	BUF PB	15 mL
User manual		1

* Zur Herstellung von Arbeitslösungen und zu den Lagerungsbedingungen siehe Abschnitt 3.

1.2 Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die benötigte Geräteausstattung kann je nach Verarbeitung (z. B. manuell oder automatisiert) und Geräteaufbau oder -konfiguration unterschiedlich ausfallen. Bitte erkundigen Sie sich bei Ihrem lokalen Hersteller der Plattform nach den dafür spezifischen Verbrauchsmaterialien. Weitere Einzelheiten zur Automatisierung von NucleoMag® Dx Pathogen finden Sie im Abschnitt 2.7.

Produkt	REF	Packung mit
Magnet für die Trennung mit magnetischen Beads, NucleoMag® SEP	744900	1
Trennplatte für die Trennung mit magnetischen Beads, Square-well Block (96-Well-Block mit quadratischen Wells, Volumen je 2,1 mL)	740481 740481.24	4 24
Elutionsplatte zur Gewinnung gereinigter Nukleinsäuren, U-Boden-Elutionsplatte (96-Well-Mikrotiterplatte [0,3 mL] mit 300 µL-U-Boden-Wells)	740486.24	24

Reagenzien:

- 80 %iges Ethanol (v/v) (Ethanol absolut oder nicht vergällt)

Verbrauchsmaterialien:

- Einwegpipettenspitzen (zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen werden Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere und RNase-freie Pipettenspitzen empfohlen)

Geräte für die manuelle Probenvorbereitung

- Handpipetten, vorzugsweise elektronische 8-Kanal-Pipetten.
- Geeignetes Schüttelgerät (siehe Abschnitt 2.7)
- Persönliche Schutzausrüstung (z. B. Laborkittel, Handschuhe, Schutzbrille)

1.3 Informationen zu diesem Benutzerhandbuch

Es wird dringend empfohlen, den detaillierten Protokollteil dieses Benutzerhandbuchs zu lesen. Das Protokoll auf einen Blick ist nur als ergänzendes Hilfsmittel zum schnellen Nachschlagen während der Durchführung des Reinigungsverfahrens gedacht.

Bitte wenden Sie sich an den Technischen Kundendienst, falls Sie Informationen über Änderungen des aktuellen Benutzerhandbuchs gegenüber früheren Versionen benötigen.

Kontaktinformationen

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG

Valenciener Str. 11

52355 Düren

Deutschland

Tel.: +49 24 21 969-0

Gebührenfrei: 0800 26 16 000 (nur Deutschland)

E-Mail: info@mn-net.com

Technischer Support – Bioanalytik

Tel.: +49 24 21 969-333

E-Mail: support@mn-net.com

Benutzerhandbücher in weiteren Sprachen sind im Downloads-Bereich auf der Produktseite verfügbar.

Les manuels d'utilisation dans d'autres langues sont disponibles dans la section Téléchargements de la page du produit.

Los manuales de usuario en otros idiomas están disponibles en la sección de descargas de la página del producto.

Podręczniki użytkownika w innych językach są dostępne w obszarze pobierania na stronie produktu.

Uživatelské příručky v jiných jazycích jsou k dispozici v sekci Ke stažení na stránce produktu.

Más nyelvű felhasználói kézikönyvek a termékoldalán található letöltési területen érhetők el.

I manuali d'uso in altre lingue sono disponibili nell'area download della pagina del prodotto.



2 Produktbeschreibung

2.1 Bestimmungsgemäßer Gebrauch

NucleoMag® Dx Pathogen ist ein Kit für die Isolierung von viraler RNA aus Abstrichen der menschlichen Atemwege und aus dem Speichel des Menschen sowie für die Isolierung von viraler RNA und viraler DNA aus unbehandelten menschlichen Stuhlproben für die anschließende *In-vitro*-Diagnostik.

Das Produkt liefert gereinigte virale RNA und virale DNA, die für nachfolgende Analysen wie qRT-PCR oder Sequenzierung verwendet werden können. Das Produkt wird von Fachkräften in Diagnostiklabors verwendet. Das Kit eignet sich für die automatisierte Verwendung auf Laborautomationsplattformen. Das NucleoMag® Dx Pathogen-Kit ist nicht für Selbsttests oder patientennahe Tests geeignet. Vom Benutzer wird Erfahrung mit molekularbiologischen Techniken erwartet; dazu zählt auch Erfahrung mit Abstrichen, Speichel, Stuhl und anderen potentiell infektiösen menschlichen Probenmaterialien. Es empfiehlt sich die Verwendung geeigneter Kontrollen, z. B. von internen Kontrollen, Extraktionskontrollen, Positiv- und Negativkontrollen.

2.2 Anwendungseinschränkungen des Produkts

NucleoMag® Dx Pathogen ist für Abstriche der Atemwege sowie für Speichel- und unbehandelte Stuhlproben des Menschen geeignet. NucleoMag® Dx Pathogen ist nicht für andere Probenmaterialien validiert worden. Nasopharyngeale (NP) Abstriche können für die Untersuchung asymptomatischer Personen im Gesundheitswesen verwendet werden. Für die Untersuchung symptomatischer Patienten sind u. U. andere Probenentnahmesysteme erforderlich. Empfehlenswert sind Tupfer aus Synthetikfasern mit Kunststoffstiel. Calciumalginat-Tupfer, Tupfer mit Holzstiel oder stabilisierte menschliche Stuhlproben werden nicht empfohlen, da sie u. U. Substanzen enthalten, die den PCR-Test hemmen.

Die Leistungsfähigkeit des Produkts wurde in der SARS-CoV-2-Diagnostik anhand von frischen und unbehandelten menschlichen Atemwegsabstrichen und Speichel sowie in der Routinediagnostik von Magen-Darm-Erkrankungen unter Beweis gestellt. Dennoch sind die Leistungsmerkmale nicht für jede Viruspezies in den jeweiligen klinischen Proben oder im jeweiligen Probenstabilisierungsreagenz nachgewiesen, sondern müssen vom Benutzer validiert werden. Zusätzlich ist die Extraktion viraler Nukleinsäuren mit dem NucleoMag® Dx Pathogen auf verschiedenen Automationsplattformen vom Benutzer zu validieren.

Bitte beachten Sie die geltenden Richtlinien für die Entnahme, Handhabung und Lagerung von klinischen Proben sowie sonstige Anforderungen der Präanalytik.

2.3 Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem Qualitätsmanagementsystem von MACHEREY-NAGEL wird zur Gewährleistung einer gleichbleibenden Produktqualität jede Charge des NucleoMag® Dx Pathogen-Kits nach vorgegebenen Spezifikationen getestet.

2.4 Das Grundprinzip

Das NucleoMag[®] Dx Pathogen-Kit ist für die Isolierung von viraler RNA aus Abstrichen der menschlichen Atemwege und aus dem Speichel des Menschen sowie für die Isolierung von viraler RNA und viraler DNA aus unbehandelten menschlichen Stuhlproben bestimmt. Das Kit enthält Reagenzien und magnetische Beads für die Isolierung von 384 Proben. Das Verfahren basiert auf der reversiblen Adsorption von Nukleinsäuren an paramagnetische Beads unter geeigneten Pufferbedingungen. Die Lyse der Proben erfolgt durch Inkubation mit einem chaotrope Ionen enthaltenden Lysepuffer NPL1; unterstützt wird dies durch Proteinase-K-Verdau. Zur Bindung der Nukleinsäuren an die paramagnetischen Beads werden dem Lysat der Bindungspuffer NPB2 sowie die NucleoMag[®] B-Beads zugesetzt. Nach der magnetischen Trennung werden die paramagnetischen Beads zum Entfernen von Verunreinigungen und Salzen mit den Waschpuffern NPW3 und NPW4 sowie 80 %igem Ethanol gewaschen. Reste von Ethanol aus früheren Waschschritten werden durch Lufttrocknung entfernt. Zum Schluss werden die hochreinen viralen Nukleinsäuren mit dem Niedrigsalz-Elutionspuffer NPE5 oder Wasser eluiert. Die gereinigten viralen Nukleinsäuren können direkt in Downstream-Anwendungen eingesetzt werden. Das NucleoMag[®] Dx Pathogen-Kit kann entweder manuell oder automatisiert auf standardmäßigen Liquid-Handling-Geräten oder automatischen Magnetseparatoren zum Einsatz kommen.

Carrier RNA

Für ein optimales Ergebnis ist Carrier RNA enthalten. Die Carrier RNA verbessert die Bindung von viralen Nukleinsäuren an die magnetischen Beads und verringert das Risiko der Degradierung viraler RNA. Bitte beachten Sie, dass Eluate des NucleoMag[®] Dx Pathogen-Kits sowohl virale Nukleinsäuren als auch Carrier RNA enthalten, wobei die Menge der Carrier RNA die Menge der viralen Nukleinsäuren überschreiten kann. Bei Verwendung der Carrier RNA ist es daher nicht möglich, die mit dem Kit isolierten Nukleinsäuren mit Hilfe von Photometrie oder Fluorometrie zu quantifizieren. Zur Quantifizierung werden deshalb andere Methoden wie spezifische quantitative PCR- oder RT-PCR-Systeme empfohlen. In seltenen Fällen kann die Carrier RNA PCR-Reaktionen inhibieren. Die Menge an zugegebener Carrier RNA kann daher je nach dem verwendeten PCR-System sorgfältig optimiert werden.

2.5 Kit-Spezifikationen

Tabelle 1: Kit-Spezifikationen auf einen Blick

Parameter	NucleoMag [®] Dx Pathogen
Technologie	Magnet-Bead-Technologie
Probenmaterial	Atemwegsabstriche und Speichel (Mensch), nicht stabiliisierter/unbehandelter Stuhl (Mensch)
Probenvolumen	200 µL
Elutionsvolumen	50 – 100 µL
Präparationszeit	ca. 40 – 120 min/96 Präp. *
Verarbeitung	Manuell oder automatisiert

* Je nach Gerätekonfiguration und Einrichtung

2.6 Probenqualität und -vorbereitung

Es können sowohl nasopharyngeale (NP) Abstriche als auch andere Probenentnahmesysteme verwendet werden. Empfehlenswert sind Tupfer aus Synthetikfasern mit Kunststoffstiel. Calciumalginat-Tupfer, Tupfer mit Holzstiel oder stabilisierte menschliche Stuhlproben werden nicht empfohlen, da sie u. U. Substanzen enthalten, die den PCR-Test hemmen. Stuhlproben können entweder frisch, bei 2 bis 8 °C gelagert oder gefroren (-20 °C) sein.

Bitte beachten Sie die geltenden Richtlinien für die Entnahme, Handhabung und Lagerung von klinischen Proben sowie sonstige Anforderungen der Präanalytik.

2.7 Leistungsbewertung auf automatisierten Systemen

NucleoMag® Dx Pathogen kann automatisiert auf verschiedenen Liquid-Handling-Plattformen oder automatischen Magnetseparatoren zum Einsatz kommen. Die Extraktion viraler RNA oder viraler DNA mit dem NucleoMag® Dx Pathogen auf verschiedenen Automationsplattformen muss jedoch vom Benutzer in Verbindung mit einem Downstream-*In-vitro*-Diagnostest je nach Zielpathogen und in Verbindung mit geeigneten Kontrollen für Downstream-Anwendungen (z. B. internen Kontrollen, Extraktionskontrollen, Positiv-/Negativkontrollen) validiert werden.

Es wird dringend empfohlen, während der Anwendung von NucleoMag® Dx Pathogen auf automatisierten Plattformen Extraktionskontrollen, Positiv-/Negativkontrollen und interne Kontrollen einzusetzen sowie Kreuzkontaminationstests durchzuführen.

Die folgenden Kapitel sind ein Leitfaden für die Automatisierung des NucleoMag® Dx Pathogen-Kits und für die Bewertung der Leistung auf einem automatisierten System.

2.7.1 Allgemeine Handhabung von magnetischen Beads

Verteilung der Beads

Eine homogene Verteilung der magnetischen Beads auf die einzelnen Wells der Trennplatte ist für eine hohe Übereinstimmung zwischen den einzelnen Wells von wesentlicher Wichtigkeit. Vergewissern Sie sich daher vor dem Zuteilen der Beads, dass diese vollständig resuspendiert sind. Schütteln Sie die Vorratsflasche gut oder stellen Sie sie kurz auf einen Vortexer. Bei der Automatisierung empfiehlt sich ein Vormischschritt vor dem Ansaugen der Beads aus dem Vorratsbehälter/Röhrchen, damit die Beads resuspendiert bleiben.

2.7.2 Liquid-Handling-Systeme

NucleoMag® Dx Pathogen kann auf verschiedenen Liquid-Handling-Plattformen automatisiert werden; verwendet werden hierfür der Magnetseparator NucleoMag® SEP (MN REF: 744900) in Kombination mit dem Square-well Block (MN REF: 740481) sowie ein geeignetes Schüttelgerät zum optimalen Resuspendieren während der Bindungs-, Wasch- und Elutionsschritte. Für den vollautomatischen Einsatz an Liquid-Handling-Arbeitsplätzen wird zusätzlich ein Greifwerkzeug benötigt. Mit Hilfe des Greifers wird die Platte zum Abtrennen der Beads auf den Magnetseparator und dann zum Resuspendieren der Beads auf das Schüttelmodul befördert. Die vollständige Resuspension der magnetischen Beads während der Extraktion ist für eine zuverlässige Leistung unbedingt notwendig und sollte während der Validierung auf Liquid-Handling-Systemen überprüft werden. Alternativ können die Beads auch durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren im Puffer resuspendiert werden.

Das folgende Schema zeigt das Grundprinzip der Extraktion mit einem statischen Magnetseparator, beginnend beim Bindungsschritt mit der Zugabe von magnetischen Beads und Bindungspuffer.

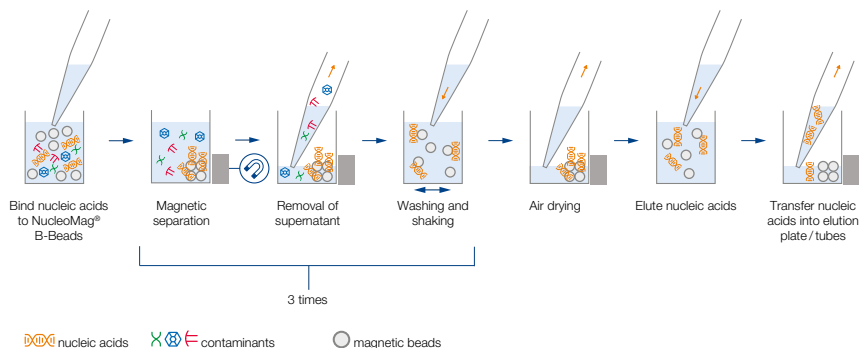


Abbildung 1 Grundprinzip der Extraktion auf der Basis von magnetischen Beads mit statischem Magnetseparator

2.7.3 Optimierung der Schüttlereinstellungen

Eine effiziente Resuspension der NucleoMag[®] B-Beads ist für eine zuverlässige Extraktion wesentlich und hängt von den Spezifikationen des verwendeten Schüttelgeräts (z.B. Geschwindigkeit und Orbit) ab. Bei Verwendung eines Plattenschüttlers für die Bindungs-, Wasch- und Elutionsschritte muss die Geschwindigkeit für den Square-well Block und das spezifische Schüttelgerät sorgfältig eingestellt werden, damit Kreuzkontaminationen von Kavität zu Kavität vermieden werden. Gehen Sie wie folgt vor:

Einstellen der Schüttlergeschwindigkeit für die Bindungs- und Waschschrte:

Geben Sie 1030 μL (Gesamtvolumen des Bindungsschritts) oder 600 μL (Volumen der Waschschrte) gefärbtes Wasser in die Wells einer Trennplatte. Stellen Sie die Platte auf den Schüttler und schütteln Sie sie 30 Sekunden lang bei moderater Geschwindigkeitseinstellung. Schalten Sie den Schüttler aus und überprüfen Sie die Plattenoberfläche auf kleine gefärbte Wassertröpfchen.

Erhöhen Sie die Geschwindigkeit, schütteln Sie weitere 30 Sekunden und überprüfen Sie die Plattenoberfläche erneut auf Tröpfchen.

Erhöhen Sie die Geschwindigkeit so lange, bis Sie Tröpfchen oben auf der Trennplatte erkennen. Reduzieren Sie die Geschwindigkeit, prüfen Sie erneut und verwenden Sie diese Einstellung für den Waschschrte.

Einstellen der Schüttlergeschwindigkeit für den Elutionsschrte:

Geben Sie 100 μL gefärbtes Wasser in die Wells einer Sammelplatte und verfahren Sie wie oben beschrieben.

Die folgende Tabelle soll einen Überblick über auf verschiedenen Plattformen bereits getestete Einstellungen geben und kann während des Automatisierungsprozesses als erster Leitfaden dienen. Es wird dringend empfohlen, bei der Validierung interne Kontrollen, Extraktions- sowie Positiv- und Negativkontrollen anzuwenden. Zudem wird empfohlen, das Magnet-Bead-

Pellet 30 Sekunden lang auf einem Schüttelgerät zu lockern, bevor der Puffer zugegeben wird, um das Resuspendieren der magnetischen Beads zu erleichtern. Je nach Effizienz der Resuspendierung kann es erforderlich sein, einen Mischschritt mit der Pipette durchzuführen.

Liquid-Handling-System/Schüttelgerät	Geschwindigkeit	Zeit
Thermomixer Comfort (Eppendorf)	Lyse: 600 rpm	15 Min.
	Bindung: 1000 rpm	5 Min.
	Waschen: 1000 rpm	2 Min.
	Elution: 1000 rpm	5 Min.
epMotion® 5075t TMX (Eppendorf)	Lyse: 1200 rpm	15 Min.
	Bindung: 1000 rpm	5 Min.
	Waschen: 1200 rpm	2 Min.
	Elution: 1200 rpm	5 Min.
Te-Shake™ (Tecan)	Lyse: 1400 rpm	15 Min.
	Bindung: 1400 rpm*	5 Min.
	Waschen: 1400 rpm **	3 Min.
	Elution: 1000 rpm	5 Min.
Hamilton Heater Shaker HHS (Hamilton)	Lyse: 1200 rpm	15 Min.
	Bindung: 1200 rpm	5 Min.
	Waschen: 1200 rpm	2 Min.
	Elution: 1200 rpm	5 Min.

Es wird dringend empfohlen, während der Anwendung und Anpassung des NucleoMag® Dx Pathogen-Kits auf automatisierten Plattformen einen ersten Kreuzkontaminationstest durchzuführen (z. B. Schachbrettmuster aus positiven und negativen Proben).

Einzelne Protokollschritte können je nach verfügbaren Verbrauchsmaterialien, Hardware, Plattform und Geräteeinstellung abweichen. Der automatisierte Arbeitsablauf oder die Vorschrift für die Extraktion viraler Nukleinsäuren mit dem NucleoMag® Dx Pathogen-Kit auf verschiedenen Automationsplattformen sind vom Benutzer in Verbindung mit der jeweiligen Downstream-Analyse zu validieren.

* Einschließlich der Pipettenmischschritte

** Richtung abwechseln

2.7.4 Automatisierte Systeme zur Magnetseparation

NucleoMag® Dx Pathogen kann auf verschiedenen automatisierten Magnetseparationsplattformen mit den für das jeweilige Gerät spezifischen Verbrauchsmaterialien automatisiert werden. Die magnetischen Beads werden in der Regel durch die Bewegung des Kunststoffmantels (Tip Comb), der die Magnetstäbe umgibt, resuspendiert. Im Anschluss an die Bindungs-, Wasch- und Elutionsschritte werden die Beads mit den Magnetstäben wieder gesammelt. In den meisten Fällen müssen Puffer und Komponenten vor Beginn des Aufreinigungsprotokolls einzeln dosiert werden. Achten Sie bitte darauf, dass das maximale Füllvolumen pro Reaktionsbehälter gemäß den Spezifikationen des Herstellers nicht überschritten wird. Sämtliche Einstellungen sind vom Benutzer in Verbindung mit dessen spezifischer Plattformkonfiguration und Downstream-Analyse zu validieren. Es wird dringend empfohlen, bei der Validierung der Plattformeinstellungen interne Kontrollen, Extraktions- sowie Positiv- und Negativkontrollen anzuwenden.

Das folgende Schema zeigt das Grundprinzip der Extraktion mit einem automatischen System zur magnetischen Trennung.

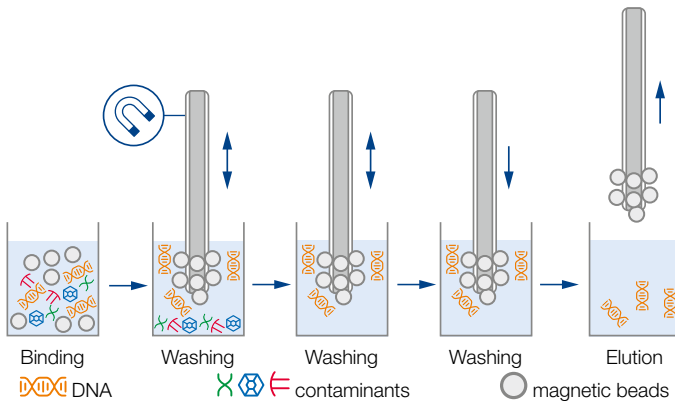


Abbildung 2 Grundprinzip der Extraktion auf der Basis von magnetischen Beads mit automatisiertem Trennsystem

2.8 Elutionsverfahren

Die gereinigte virale RNA oder virale DNA kann direkt mit dem mitgelieferten Elutionspuffer eluiert werden. Die Elution kann in einem Volumen von 50–100 µL durchgeführt werden. Es ist entscheidend, dass die NucleoMag® B-Beads während des Elutionsschritts vollständig mit Elutionspuffer bedeckt sind. Für eine effiziente Elution muss das Magnet-Bead-Pellet vollständig im Elutionspuffer resuspendiert werden.

Lagerung von Nukleinsäuren

Empfehlung:

Kurzfristige Lagerung (bis zu 24 Stunden): 2–8 °C

Langfristige Lagerung (über 24 Stunden): -20 °C

2.9 Analytische und klinische Leistungsfähigkeit

Die analytische Leistung des NucleoMag[®] Dx Pathogen wurde anhand einer Downstream-RT-qPCR von isolierter MS2-RNA bewertet. Die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Laufs wurde aus der parallelen Isolierung von 96 Proben berechnet. Bei $n = 96$ wurden ein mittlerer Ct-Wert von $27,92 \pm 0,118$ und ein VK $< 1\%$ erzielt. Die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Läufen wurde aus 3 unabhängigen MS2-RNA-Isolierungsläufen berechnet. Bei 4 MS2-RNA-Inputs war die Standardabweichung von 3 Läufen jeweils kleiner als 0,1 mit einem VK von 0,26%. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit zwischen einzelnen Chargen wurden 3 Chargen von NucleoMag[®] Dx Pathogen nebeneinander getestet. Bei 3 MS2-RNA-Inputs war die Standardabweichung von 3 Chargen jeweils kleiner als 0,61 mit einem VK von 1,49%.

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit zwischen einzelnen Bedienern wurden vier MS2-RNA-Inputs in zwei unabhängigen Läufen von zwei verschiedenen Bedienern isoliert. Die Berechnung des durchschnittlichen $\Delta\Delta$ Ct-Werts für die 4 Konzentrationen zwischen den Bedienern ergab einen Wert von weniger als 0,1.

In einer Studie mit SARS-CoV-2-positiven Proben wurden log₁₀-Verdünnungsreihen in negativem Poolmaterial aus Mund- und Nasenabstrichen sowie Speichel hergestellt. Die extrahierte RNA wurde auf zwei verschiedenen Echtzeit-RT-PCR-Systemen, mit zwei verschiedenen Mastermixen in Kombination mit zwei verschiedenen internen Kontrollsystemen (beta-actin-DNA-Mix 2 und IC2-RNA/EGFP-Mix 1) getestet.

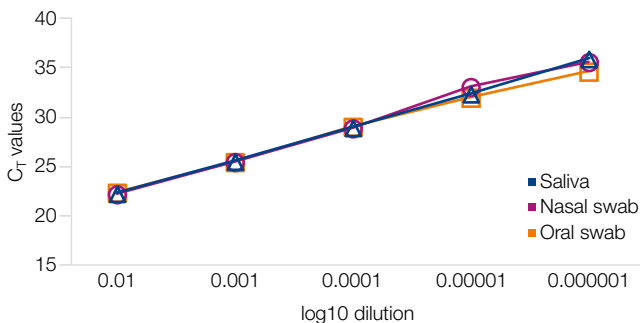


Abbildung 3 Log₁₀-Verdünnungsreihen von SARS-CoV-2 in Speichel, Nasen- und Mundabstrichen. NucleoMag[®] Dx Pathogen auf KingFisher[™] Flex (Thermo Fisher Scientific), AgPath-ID[™] One-Step RT-PCR-Kit (Thermo Fisher Scientific), nCoV-IP4-Assay (Institut Pasteur, Paris). Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. B. Hoffmann (Friedrich-Löffler-Institut) zur Verfügung gestellt.

Zur Bewertung der klinischen Leistungsfähigkeit wurde SARS-CoV2-RNA aus Abstrichen isoliert und in SARS-CoV2-RT-qPCR-Assays amplifiziert. Die Positiv- und Negativkontrollen wurden evaluiert. In 27 Läufen mit 94 Proben pro Lauf wurden alle 27 Positiv- und alle 27 Negativkontrollen wie erwartet gemessen. Die diagnostische Sensitivität und die diagnostische Spezifität betragen 100%.

Die Leistung des NucleoMag® Dx Pathogen bei Stuhlproben wird am Beispiel des Blauzungenvirus (dsRNA-Virus) demonstriert.

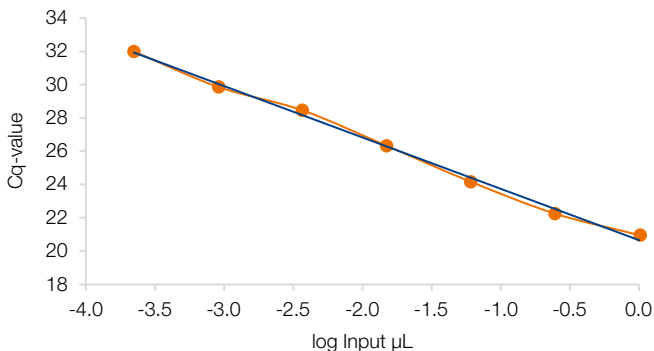


Abbildung 4 qRT-PCR-Analyse einer 1:4-Verdünnungsreihe über sieben Verdünnungsschritte von BTV (dsRNA), extrahiert aus menschlichem Stuhl. Das eingesetzte Probenvolumen wird in einer logarithmischen Skala angezeigt. Die mittleren Cq-Werte der Verdünnungsreihe sind als orange gepunktete Linie dargestellt. Die lineare Regressionskurve (blaue durchgezogene Linie) weist eine Steigung von -3,12 und einen R^2 -Wert von 0,99 auf.

Die diagnostische Sensitivität und Spezifität in Stuhlproben werden am Beispiel des Norovirus (ssRNA-Virus) demonstriert. Die virale RNA wurde aus übrig gebliebenen Stuhlproben mit bekanntem Virusstatus, die aus der klinischen Routine stammten, isoliert. Die Eluate wurden mittels q(RT)-PCR unter Verwendung des RIDA Gene Viral Stool Panel I (R-Biopharm) analysiert. In einer Studie mit 93 echten positiven Proben lag die diagnostische Sensitivität bei 94 %. In einer zweiten Studie mit 96 echten negativen Proben lag die diagnostische Spezifität bei 99 %.

3 Lagerungsbedingungen und Zubereitung der Arbeitslösungen

Achtung! NPL1, NPB2, NPW3, NPW4 und der Carrier RNA-Puffer enthalten chaotropes Salz (z. B. Guanidinhydrochlorid und/oder Natriumperchlorat); diese Stoffe können in Verbindung mit Bleichmittel (Natriumhypochlorit) hochreaktive Verbindungen bilden! Bleichmittel oder säurehaltige Lösungen dürfen daher NIEMALS direkt in den Probenaufbereitungsabfall gelangen. Tragen Sie geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und eine Schutzbrille!

- Überprüfen Sie nach Erhalt des Kits sämtliche Komponenten auf Schäden. Sollte der Inhalt des Kits (z. B. Pufferflaschen, Röhrchen mit Schraubverschluss oder Glasfläschchen) beschädigt sein, wenden Sie sich bitte an den technischen Support und Kundendienst von MACHEREY-NAGEL oder an Ihren Händler vor Ort.
- Beschädigte Kit-Bestandteile dürfen nicht verwendet werden.
- Verwenden Sie RNase-freie Gerätschaften.
- Nach Erhalt sind alle Komponenten des **NucleoMag® Dx Pathogen**-Kits bei Raumtemperatur (18–25 °C) zu lagern. Verwenden Sie das Produkt nicht nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Lyophilisierte Proteinase K kann bei Raumtemperatur (18–25 °C) bis zum Verfallsdatum gelagert werden, ohne dass die Leistung nachlässt. Rekonstituierte Proteinase K ist bei -20 °C bis zu 6 Monate haltbar, jedoch nur innerhalb des Verfallsdatums.
- Lyophilisierte Carrier RNA kann bei Raumtemperatur (18–25 °C) bis zum Verfallsdatum gelagert werden, ohne dass die Leistung nachlässt. Rekonstituierte Carrier RNA ist bei -20 °C bis zu 6 Monate haltbar, jedoch nur innerhalb des Verfallsdatums.
- Sämtliche Puffer werden gebrauchsfertig geliefert.

Bevor Sie mit einem **NucleoMag® Dx Pathogen**-Protokoll beginnen, bereiten Sie Folgendes vor:

- **Proteinase K:** Fügen Sie vor der ersten Verwendung des Kits 3,35 mL Proteinasepuffer PB zu jedem Fläschchen der **lyophilisierten Proteinase K hinzu und lösen Sie die Proteinase K auf**. Gelöste Proteinase-K-Lösung ist bei -20 °C bis zu 6 Monate haltbar, jedoch nur innerhalb des Verfallsdatums.
- **Carrier RNA:** Fügen Sie vor der ersten Verwendung des Kits 500 µL Carrier RNA-Puffer zu jedem Fläschchen der **lyophilisierten Carrier RNA** hinzu. Lösen Sie die Carrier RNA auf und lagern Sie die aufgelöste Carrier RNA-Lösung in Aliquots bei -20 °C für bis zu 6 Monate, jedoch nur innerhalb des Verfallsdatums.
Anmerkung: Aufgrund des Herstellungsverfahrens und der geringen Menge an Carrier RNA, die in dem Fläschchen enthalten ist, ist die Carrier RNA möglicherweise im Fläschchen kaum sichtbar.
- Rekonstituierte Carrier RNA darf nicht wiederholt eingefroren, aufgetaut oder aufgewärmt werden! Häufiges Einfrieren und Wiederauftauen, häufiges Erwärmen, Temperaturen über 80 °C und eine längere Wärmeinkubation beschleunigen die Degradierung der Carrier RNA. Es empfiehlt sich, rekonstituierte Proteinase K und Carrier RNA in Aliquots zu lagern.

NucleoMag® Dx Pathogen

REF	4 x 96 Präp. 744215.4
Proteinase K (lyophilized)	3 Fläschchen (75 mg/Fläschchen) Vor der ersten Verwendung 3,35 mL Puffer PB hinzufügen.
Carrier RNA (lyophilized)	4 Fläschchen (400 µg/Flasche) Vor der ersten Verwendung in 500 µL Carrier RNA- Puffer auflösen.

4 Sicherheitshinweise

Tragen Sie bei der Arbeit mit dem **NucleoMag® Dx Pathogen**-Kit geeignete Schutzkleidung (z. B. Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille). Weitere Informationen finden Sie in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (MSDS), die online unter **www.mn-net.com/msds** verfügbar sind.



Vorsicht: Guanidinhydrochlorid im Lysepuffer NPL1, Natriumperchlorat in den Puffern NPB2, NPW3, NPW4 und Guanidinthiocyanat im Carrier RNA-Puffer können in Verbindung mit Bleichmitteln hochreaktive Verbindungen bilden! Bleichmittel oder säurehaltige Lösungen dürfen daher niemals direkt in den Probenaufbereitungsabfall gelangen.

*Der mit dem **NucleoMag® Dx Pathogen**-Kit erzeugte Abfall wurde nicht auf infektiöse Rückstände getestet. Eine Kontamination des Flüssigabfalls mit infektiösen Rückständen ist aufgrund des stark denaturierenden Lysepuffers und der Proteinase-K-Behandlung sehr unwahrscheinlich, kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Flüssigabfälle sind daher als infektiös zu betrachten und müssen gemäß den örtlichen Sicherheitsvorschriften behandelt und entsorgt werden.*

4.1 Entsorgung

Entsorgen Sie gefährliche, infektiöse oder biologisch kontaminierte Materialien auf sichere und vertretbare Weise und in Übereinstimmung mit allen örtlichen und gesetzlichen Vorschriften.

5 Protokoll für die Isolierung von viraler RNA aus Abstrichen der menschlichen Atemwege und aus dem Speichel des Menschen sowie von viraler RNA und viraler DNA aus menschlichen Stuhlproben

Einzelne Protokollschritte können je nach verfügbaren Verbrauchsmaterialien, Hardware, Plattform und Geräteeinstellung abweichen. Der automatisierte Arbeitsablauf oder die Vorschrift für die Extraktion von viraler RNA und viraler DNA mit dem NucleoMag® Dx Pathogen-Kit auf verschiedenen Automationsplattformen sind vom Benutzer in Verbindung mit der jeweiligen Downstream-Analyse zu validieren.

Das folgende Verfahren enthält Anweisungen für die manuelle Bearbeitung einer Einzelprobe in einem Square-well Block in Kombination mit dem Eppendorf Thermomixer comfort. Es können jedoch mehrere Proben (bis zu 96 Proben pro Block) gleichzeitig manuell oder automatisch verarbeitet werden. Bitte lesen Sie Abschnitt 2 sorgfältig durch, bevor Sie mit der Extraktion oder Durchführung auf automatisierten Plattformen beginnen.

5.1 Vorbereitung der Probenmaterialien

Das NucleoMag® Dx Pathogen-Kit ist für frische und unbehandelte Abstriche der Atemwege, Speichel und unbehandelte Stuhlproben des Menschen geeignet. Nasopharyngeale (NP) Abstriche können für die Untersuchung asymptomatischer Personen im Gesundheitswesen verwendet werden. Für die Untersuchung symptomatischer Patienten sind u.U. andere Probenentnahmesysteme erforderlich. Empfehlenswert sind Tupfer aus Synthetikfasern mit Kunststoffstiel. Calciumalginat-Tupfer, Tupfer mit Holzstiel oder stabilisierte menschliche Stuhlproben werden nicht empfohlen, da sie u.U. Substanzen enthalten, die den PCR-Test hemmen. Bitte beachten Sie die geltenden Richtlinien für die Entnahme, Handhabung und Lagerung von klinischen Proben sowie sonstige Anforderungen der Präanalytik.

Bitte beachten Sie die geltenden Richtlinien für die Entnahme, Handhabung und Lagerung von klinischen Proben sowie sonstige Anforderungen der Präanalytik.

a) Abstrichproben

Inkubieren Sie die Abstrichtupfer schüttelnd in PBS, einer Natriumchloridlösung oder Zellkulturmedium für 30 min. Stellen Sie sicher, dass der Kopf des Abstrichtupfers vollständig in die Flüssigkeit eingetaucht ist. Transferieren Sie 200 µL der Lösung für die weitere Prozessierung. Falls notwendig, drücken Sie den Abstrichtupferkopf gegen die Wand des Gefäßes, um weitere Flüssigkeit zurückzuerhalten.

b) Speichel

Frische und unbehandelte Speichelproben können direkt dem Extraktionsverfahren unterzogen werden. Bei hochviskosen Proben empfiehlt es sich, die Speichelproben mit steriler PBS zu verdünnen. 100 µL oder 200 µL dieser Lösung werden für die weitere Verarbeitung verwendet. Bei der Verarbeitung von weniger als 200 µL Probe bringen Sie diese mit PBS-Puffer auf ein Endvolumen von 200 µL.

c) Stuhl

Mischen Sie 1 Volumen Stuhl (z. B. 500 µl oder eine erbsengroße Menge) mit dem gleichen Volumen PBS-Puffer oder sterilem, RNase-freiem ddH₂O. Nun 10 Sekunden lang vortexen

um kräftig zu mischen. Anschließend bei niedriger Geschwindigkeit für 3 Minuten bei 500 x g zentrifugieren. 200 µL des geklärten Überstands werden für die weitere Verarbeitung verwendet.

Vor Beginn des Verfahrens:

- Stellen Sie sicher, dass die Proteinase K nach den Angaben in Kapitel 3 vorbereitet wurde.
- Stellen Sie sicher, dass die Carrier RNA nach den Angaben in Kapitel 3 vorbereitet wurde.
- Stellen Sie sicher, dass 80 % Ethanol (absolut) zur Verfügung steht.
- Stellen Sie sicher, dass die Automationsplattform oder der Schüttler entsprechend eingestellt /justiert wurde.
- Geben Sie den Proben Gelegenheit sich auf Raumtemperatur (18–25 °C) zu äquilibrieren. Stellen Sie sicher, dass die Proben gut durchmischt sind.
- Verwenden Sie keine Reagenzien aus anderen Kits oder Chargen.
- Geben Sie die Proteinase K Lösung niemals direkt zum Lysis Buffer NPL1. Zunächst muss die Probe mit Lysis Buffer NPL1 gemischt werden, bevor die Proteinase K hinzugegeben wird.
- Alle Prozessierungsschritte sind bei Raumtemperatur (18–25 °C) durchzuführen.

5.2 Übersichtprotokoll

Das Übersichtprotokoll dient nur zur Ergänzung. Bitte lesen Sie das detaillierte Protokoll (Abschnitt 5.3) sowie Kapitel 2, bevor Sie mit der Durchführung beginnen. Die unten aufgeführte Prozedur beschreibt die manuelle Prozessierung einer einzelnen Probe in dem Square-well Block in Kombination mit dem Eppendorf Thermomixer comforth.

Stellen Sie sicher, dass Sie die oberen Kanten der Kavitäten nicht benetzen.

1 Bereitstellung der Probe und Lyse	
1	200 µL Probe im Square-well Block
2	180 µL NPL1
3	4 µL Carrier RNA Lösung
4	20 µL Proteinase K Lösung
5	Durchmischen Sie vollständig mittels wiederholtem Auf-und Abpipettieren oder Schütteln
6	Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min bei 600 rpm

2 Bindung von Nukleinsäuren

- 7 20 µL NucleoMag® B-Beads
 - 8 600 µL NPB2
 - 9 Durchmischen Sie vollständig mittels wiederholtem Auf- und Abpipettieren oder Schütteln und inkubieren Sie für 5 min bei 1000 rpm
 - 10 Separieren Sie die magnetischen Beads für 2 min
 - 11 Entfernen Sie den Überstand
 - 12 Entfernen Sie den Square-well Block vom NucleoMag® SEP
-

3 Waschen der magnetischen Beads

- 13 600 µL NPW3
 - 14 Durchmischen Sie vollständig mittels wiederholtem Auf- und Abpipettieren oder Schütteln und einer Inkubation für 2 min bei 1000 rpm
 - 15 Separieren Sie die magnetischen Beads für 2 min
 - 16 Entfernen Sie den Überstand
 - 17 Entfernen Sie den Square-well Block vom NucleoMag® SEP
 - 18 600 µL NPW4
 - 19 Durchmischen Sie vollständig mittels wiederholtem Auf- und Abpipettieren oder Schütteln und einer Inkubation für 2 min bei 1000 rpm
 - 20 Separieren Sie die magnetischen Beads für 2 min
 - 21 Entfernen Sie den Überstand
 - 22 Entfernen Sie den Square-well Block vom NucleoMag® SEP
 - 23 600 µL 80 % Ethanol
 - 24 Durchmischen Sie vollständig mittels wiederholtem Auf- und Abpipettieren oder Schütteln und einer Inkubation für 2 min bei 1000 rpm
 - 25 Separieren Sie die magnetischen Beads für 2 min
 - 26 Entfernen Sie den Überstand
-

4 Trocknen

- 27 Lassen Sie die magnetischen Beads für 10 min bei Raumtemperatur lufttrocknen.
-

5 Elution der Nukleinsäuren

- 28** Entfernen Sie den Square-well Block vom NucleoMag® SEP
- 29** 100 µL NPE5
- 30** Durchmischen Sie vollständig mittels wiederholtem Auf- und Abpipettieren oder Schütteln
- 31** Inkubation für 5 min bei 1000 rpm.
- 32** Separieren Sie die magnetischen Beads für 2 min
- 33** Transferieren Sie den Überstand der eluierten Probe in die Elutionsplatte.
-

5.3 Detailliertes Protokoll

Die unten aufgeführte Prozedur beschreibt die manuelle Prozessierung einer einzelnen Probe in dem Square-well Block in Kombination mit dem Eppendorf Thermomixer comfort. Einzelne Protokollschritte können in Abhängigkeit der verfügbaren Verbrauchsmaterialien, des Aufbaus, der Konfiguration und der Plattform variieren und müssen vom Anwender validiert werden.

Alternativ kann eine Isolation von viraler RNA und viraler DNA in einem Reaktionsgefäß mit einem kompatiblen magnetischen Separator durchgeführt werden. Dieses Protokoll beschreibt die manuelle Prozessierung und kann als Richtlinie für die Adaption des Kits auf Automationsplattform herangezogen werden.

Stellen Sie sicher, dass Sie die oberen Kanten der Kavitäten nicht benetzen.

-
- 1** Geben Sie **200 µL Probe** in jede Kavität des Square-well Blocks
-
- 2** Fügen Sie **180 µL Lysis Buffer NPL1** zu jeder Probe hinzu.
-
- 3** Fügen Sie **4 µL of Carrier RNA** Lösung zu jeder Probe hinzu.
-
- 4** Fügen Sie **20 µL Proteinase K** Lösung zu jeder Probe hinzu.
-
- 5** Durchmischen Sie vollständig mittels wiederholtem Auf- und Abpipettieren oder Schütteln.
- Optional: Verschließen Sie die Platte mit einer geeigneten Klebefolie.
-
- 6** Inkubieren Sie die Proben für **15 min bei Raumtemperatur und 600 rpm**.
- Optional: Zentrifugieren Sie die Platte kurz, im Falle einer zugeklebten oder verschlossenen Platte, um Tropfen vom Verschluss zu entfernen.
-
- 7** Fügen Sie **20 µL resuspendierte NucleoMag® B-Beads** zu jeder Probe hinzu.
- Anmerkung: Stellen Sie sicher, dass die NucleoMag® B-Beads vollständig resuspendiert sind, bevor Sie diese aus der Vorratsflasche entnehmen. Vortexen Sie die Vorratsflasche bis Sie eine homogene Suspension erhalten.
-
- 8** Fügen Sie **600 µL Binding Buffer NPB2** zu jeder Probe hinzu.
-

- 9 Durchmischen Sie vollständig mittels wiederholtem Auf- und Abpipettieren oder Schütteln und inkubieren Sie für 5 min bei 1000 rpm.
Anmerkung: Es sollte eine homogene Lösung erhalten werden.
- 10 Platzieren Sie den Square-well Block auf dem Magnetseparator NucleoMag® SEP.
- 11 Mindestens 2 Minuten warten, bis alle Beads vom Magneten angezogen worden sind.
Anmerkung: Je nach Art der Probe sollte eine klare Lösung zu sehen sein.
- 12 Überstand vorsichtig durch Pipettieren entfernen und verwerfen.
Anmerkung: Achten Sie beim Absaugen des Überstands darauf, dass die vom Magneten angezogenen Beads nicht aufgewirbelt werden.
- 13 Entfernen Sie den Square-well Block vom Magnetseparator NucleoMag® SEP.
- 14 Fügen Sie **600 µL Buffer NPW3** zu jeder Probe hinzu.
- 15 Platzieren Sie den Square-well Block auf den Thermomixer.
- 16 Resuspendieren Sie die magnetischen Beads mittels Schütteln für 2 min bei 1000 rpm bis die Beads vollständig resuspendiert sind.
- 17 Platzieren Sie den Square-well Block auf dem Magnetseparator NucleoMag® SEP.
- 18 Warten Sie mindestens 2 min bis alle Beads vom Magneten angezogen worden sind
- 19 Entfernen und verwerfen Sie vorsichtig den Überstand mittels Pipettieren.
- 20 Entfernen Sie den Square-well Block vom Magnetseparator NucleoMag® SEP.
- 21 Fügen Sie **600 µL Buffer NPW4** zu jeder Probe hinzu.
- 22 Platzieren Sie den Square-well Block auf den Thermomixer.
- 23 Resuspendieren Sie die magnetischen Beads mittels Schütteln für 2 min bei 1000 rpm bis die Beads vollständig resuspendiert sind.
- 24 Platzieren Sie den Square-well Block auf dem Magnetseparator NucleoMag® SEP.
- 25 Warten Sie mindestens 2 min bis alle Beads vom Magneten angezogen worden sind
- 26 Entfernen und verwerfen Sie vorsichtig den Überstand mittels Pipettieren.
- 27 Entfernen Sie den Square-well Block vom Magnetseparator NucleoMag® SEP.
- 28 Fügen Sie **600 µL des 80 % Ethanol**s zu jeder Probe hinzu.
- 29 Platzieren Sie den Square-well Block auf den Thermomixer.
- 30 Resuspendieren Sie die magnetischen Beads mittels Schütteln für 2 min bei 1000 rpm bis die Beads vollständig resuspendiert sind.
- 31 Platzieren Sie den Square-well Block auf dem Magnetseparator NucleoMag® SEP.

-
- 32** Warten Sie mindestens 2 min bis alle Beads vom Magneten angezogen worden sind.
-
- 33** Entfernen und verwerfen Sie vorsichtig den Überstand mittels Pipettieren.
-
- 34** Lassen Sie das magnetische Beadpellet für 10 min bei Raumtemperatur lufttrocknen.
Anmerkung: Stellen Sie sicher, dass der 80%ige Ethanol des finalen Waschschriffs vor dem Lufttrocknungsschritt vollständig entfernt wurde.
-
- 35** Entfernen Sie den Square-well Block vom Magnetseparator NucleoMag® SEP.
-
- 36** Fügen Sie **100 µL Elution Buffer NPE5** zu jeder Kavität hinzu.
-
- 37** Platzieren Sie den Square-well Block auf den Thermomixer.
-
- 38** Resuspendieren Sie die magnetischen Beads mittels moderatem Schütteln für 5 min bei Raumtemperatur bei 1000 rpm bis die Beads vollständig resuspendiert sind.
-
- 39** Platzieren Sie den Square-well Block auf dem Magnetseparator NucleoMag® SEP.
-
- 40** Warten Sie mindestens 2 min bis alle Beads vom Magneten angezogen worden sind
-
- 41** Transferieren Sie vorsichtig das Eluat in eine geeignete Elutionsplatte.
Anmerkung: Achten Sie darauf, das magnetische Bead-Pellet nicht aufzumischen.
-

6 Anhang

6.1 Fehlerbehebung

Problem	Mögliche Ursache und Vorschläge zur Behebung
Schlechte Ausbeute/ geringe Sensitivität	<i>Unvollständige Lyse der Probe</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Die Probe wurde nicht ausreichend mit Lysepuffer und Proteinase K durchmischt. Die Mischung muss kontinuierlich geschüttelt werden. Alternativ kann die Inkubationszeit mit Proteinase K verlängert werden.
	<i>Unzureichendes Volumen des Elutionspuffers</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Das Bead-Pellet muss vollständig mit Elutionspuffer bedeckt sein und vollständig resuspendiert werden.
	<i>Unzureichende Funktion des Elutionspuffers während des Elutionsschritts</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Entfernen Sie alle Puffer vollständig vom Beadpellet nach jeder Separation im Bindungs- und in den Waschschrritten. Verbleibende Pufferreste können die Effizienz der nachfolgenden Schritte verringern.
	<i>Aspiration des separierten Bead-Pellets</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Vermeiden Sie ein Aufmischen des Bead-Pellets während Sie den Überstand abnehmen. Besondere Vorsicht ist geboten, wenn der Überstand des Lysats im Bindungsschritt abgenommen wird, da die Lösung häufig undurchsichtig ist und das Bead-Pellet daher nicht erkennbar ist.
	<i>Aspiration und Verlust von magnetischen Beads</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Die Zeit für die Magnetseparation ist zu kurz oder die Aspirationsgeschwindigkeit zu hoch.
Geringe Reinheit/ geringe Sensitivität	<i>Unzureichendes Waschverfahren</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Verwenden Sie nur passende Kombinationen von Separator und Platte, z. B. den Square-well Block in Kombination mit dem NucleoMag[®] SEP. Achten Sie darauf, dass die Beads während des Waschvorgangs vollständig resuspendiert werden (z. B. anhand einer gleichmäßig bräunlichen Flüssigkeit). Wenn Schütteln nicht ausreicht, um die Beads vollständig zu resuspendieren, mischen Sie diese durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren.

Problem	Mögliche Ursache und Vorschläge zur Behebung
Mangelhafte Leistung der RNA / DNA in Downstream-Anwendungen/RT-qPCR-Hemmung	<p data-bbox="348 209 813 233"><i>Verschleppung von Ethanol aus den Waschpuffern</i></p> <ul data-bbox="348 245 984 485" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="348 245 984 325">• Achten Sie darauf, dass die 80 %ige Ethanol-Waschlösung aus dem letzten Waschschrift vollständig entfernt wird. Reste von Ethanol wirken sich störend auf Downstream-Anwendungen aus. <li data-bbox="348 338 984 485">• Achten Sie darauf, den Überstand nach jeder Magnetseparation vollständig zu entfernen. Überprüfen Sie nach jedem Entfernen des Überstandes, ob noch Reste von Waschpuffer vorhanden sind. Passen Sie die Aspirationshöhen an, falls nach dem Entfernen des Überstandes ein zu großes Puffervolumen verbleibt. <p data-bbox="348 504 790 528"><i>Verdunstung von Ethanol aus den Waschpuffern</i></p> <ul data-bbox="348 541 984 639" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="348 541 984 639">• Verschießen Sie die Pufferflaschen fest und vermeiden Sie die Verdunstung von Ethanol aus den Pufferflaschen sowie auch aus den Puffern in den Vorratsbehältern. Puffer aus Puffervorratsbehältern dürfen nicht wiederverwendet werden.
Verschleppung von Beads	<p data-bbox="348 663 684 687"><i>Dauer der Magnetseparation zu kurz</i></p> <ul data-bbox="348 700 984 799" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="348 700 984 799">• Verlängern Sie die Zeit für die Separation, damit die magnetischen Beads vollständig von den Magnetstiften angezogen werden können, bevor Flüssigkeit aus dem Well aspiriert wird. <p data-bbox="348 818 818 842"><i>Aspirationsgeschwindigkeit zu hoch (Elutionsschritt)</i></p> <ul data-bbox="348 855 984 983" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="348 855 984 983">• Eine hohe Aspirationsgeschwindigkeit oder suboptimale Aspirationshöhen während des Elutionsschritts können zu einer Verschleppung von Beads führen. Verringern Sie die Aspirationsgeschwindigkeit und passen Sie die Aspirationshöhe für den Elutionsschritt an.

6.2 Meldepflicht

Bitte beachten Sie, dass jeder schwerwiegende Vorfall im Zusammenhang mit dem Produkt unverzüglich dem Hersteller sowie der zuständigen Behörde des europäischen Mitgliedstaates, in dem der Vorfall aufgetreten ist, zu melden ist. Europäische Vigilanz-Kontaktstellen: https://ec.europa.eu/health/md_sector/contact_en

6.3 Allgemeine Literatur

Thiemann F. et al. (2006) Leitfaden Molekulare Diagnostik - Grundlagen, Gesetze, Tipps und Tricks, WILEY-VCH, 1st ed., ISBN 3-527-31471-7.

Paysic J. et al- (2015). Standardization of Nucleic Acid Tests for Clinical Measurements of Bacteria and Viruses. J Clin Microbiol., 53(7), 2008–14.

Cohen, J. et al. (2016) Infectious Diseases, Elsevier, 4th ed., ISBN: 9780702062858.

Vemula S. V. et a. (2016) Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans, Viruses 8(4), 96.

6.4 Informationen zur Bestellung

Produkt	REF	Packung mit
<i>Kits mit CE-Kennzeichnung für IVD</i>		
NucleoMag [®] Dx Pathogen	744215.4	384 Präp.
NucleoSpin [®] Dx Virus	740895.50	50 Präp.
NucleoSpin [®] Dx Blood	740899.50 740899.250	50 Präp. 250 Präp.
NucleoSpin [®] Dx RNA Blood	740201.50	50 Präp.
<i>Kit für Forschungszwecke</i>		
NucleoMag [®] Pathogen (RUO)	744210.1 744210.4	1 × 96 Präp. 4 × 96 Präp.
NucleoMag [®] Pathogen Prefilled Plates (RUO)	744211	96 Präp.
<i>Zubehörprodukte</i>		
NucleoMag [®] SEP	744900	1
Square-well Blocks	740481 740481.24	4 24

Weitere Produktinformationen auf www.mn-net.com.

6.5 Erläuterung der Symbole



Artikelnummer



Chargenidentifizierung



Hersteller



Produkte für die *In-vitro*-Diagnostik



Bitte Gebrauchsanweisung lesen



Ausreichend für < n > Tests



Zulässiger Lagertemperaturbereich



Zu verwenden bis



Vorsicht: Weitere Informationen im Benutzerhandbuch



Nicht wiederverwenden



384

6.6 Nutzungseinschränkung des Produkts/Garantie

Das NucleoMag® Dx Pathogen-Kit ist ein allgemeines System für die Isolierung und Reinigung von viraler RNA aus Proben des menschlichen Respirationstrakts sowie Speichelproben oder von viraler RNA und viraler DNA aus unbehandelten menschlichen Stuhlproben für die anschließende *in-vitro*-Diagnostik.

Das Kit ist für alle Downstream-Anwendungen geeignet, bei denen eine enzymatische Amplifikation und Detektion von RNA oder DNA zur Anwendung kommt (z. B. RT-PCR, qPCR).

Alle Diagnoseergebnisse, die unter Verwendung von Nucleinsäuren, die mit dem **NucleoMag® Dx Pathogen**-Kit isoliert wurden, in Verbindung mit einem Diagnostikassay erzielt werden, sind unter Berücksichtigung zusätzlicher klinischer oder labordiagnostischer Befunde zu interpretieren.

Das **NucleoMag® Dx Pathogen**-Kit liefert kein Diagnoseergebnis. Es liegt in der alleinigen Verantwortung des Benutzers, das Kit in Verbindung mit einem Downstream-*In-vitro*-Diagnostest zu verwenden und zu validieren. NUR Produkte von MACHEREY-NAGEL, die speziell als IVD gekennzeichnet sind, sind für den Einsatz in der *In-vitro*-Diagnostik geeignet.

Sicherheitshinweise entnehmen Sie bitte dem entsprechenden Kapitel im Benutzerhandbuch oder der MSDS-Datei. Das **NucleoMag® Dx Pathogen**-Kit darf ausschließlich in einer angemessenen Testumgebung (d. h. in einem geeigneten Laborbereich) verwendet werden. Der jeweilige Benutzer haftet für alle Schäden, die aus der Anwendung des **NucleoMag® Dx Pathogen**-Kits entgegen dem im Benutzerhandbuch angegebenen bestimmungsgemäßen Verwendungszweck entstehen.

Dieses Produkt von MACHEREY-NAGEL wird mit einer Dokumentation ausgeliefert, in der die Spezifikationen und andere technische Informationen enthalten sind. MACHEREY-NAGEL gewährleistet die Einhaltung der angegebenen Spezifikationen. Die einzige Verpflichtung von MACHEREY-NAGEL und das einzige Rechtsmittel des Kunden beschränken sich auf den kostenlosen Ersatz der Produkte, falls diese nicht die zugesicherten Leistungen erbringen. Ergänzend wird auf die Allgemeinen Geschäftsbedingungen von MACHEREY-NAGEL verwiesen, die auf der Preisliste abgedruckt sind. Bitte wenden Sie sich an uns, wenn Sie ein zusätzliches Exemplar erhalten möchten.

MACHEREY-NAGEL übernimmt keine Garantie und haftet weder für Schäden oder Defekte, die durch Transport und Handhabung (Transportversicherung für Kunden ausgeschlossen) oder durch Versehen oder unsachgemäßen oder anormalen Gebrauch dieses Produkts entstehen, noch für Defekte an Produkten oder Komponenten, die nicht von MACHEREY-NAGEL hergestellt wurden, oder Schäden, die durch solche nicht von MACHEREY-NAGEL stammenden Komponenten oder Produkte entstehen.

MACHEREY-NAGEL übernimmt keine weiteren Garantien jeglicher Art und SCHLIEßT AUSDRÜCKLICH ALLE ANDEREN GARANTIE JEGLICHER ART AUS, DIREKT ODER INDIREKT, AUSDRÜCKLICH ODER STILLSCHWEIGEND, EINSCHLIEßLICH, ABER NICHT BESCHRÄNKT AUF DIE EIGNUNG, REPRODUZIERBARKEIT, HALTBARKEIT, EIGNUNG FÜR EINEN BESTIMMTEN ZWECK ODER GEBRAUCH, MARKTGÄNGIGKEIT, DEN ZUSTAND ODER JEGLICHE ANDERE ANGELEGENHEIT IN BEZUG AUF PRODUKTE VON MACHEREY-NAGEL.

In keinem Fall haftet MACHEREY-NAGEL für Ansprüche aus anderen Schäden, ob direkt, indirekt, beiläufig, kompensatorisch, vorhersehbar, als Folge oder speziell (einschließlich, aber nicht beschränkt auf Nutzungs-, Umsatz- oder Gewinnverluste), ob auf der Grundlage von Garantie, Vertrag, unerlaubter Handlung (einschließlich Fahrlässigkeit) oder

verschuldensunabhängiger Haftung, die im Zusammenhang mit dem Verkauf von oder der Nichterfüllung der angegebenen Spezifikationen durch Produkte von MACHEREY-NAGEL entstehen. Diese Garantie ist ausschließlich und MACHEREY-NAGEL übernimmt keine sonstige ausdrückliche oder stillschweigende Garantie.

Die hierin enthaltene Garantie sowie die Daten, Spezifikationen und Beschreibungen dieses Produkts von MACHEREY-NAGEL, die in den von MACHEREY-NAGEL veröffentlichten Katalogen und der Produktliteratur erscheinen, sind die alleinigen Erklärungen von MACHEREY-NAGEL bezüglich des Produkts und der Garantie. Andere schriftliche oder mündliche Erklärungen oder Zusicherungen von Mitarbeitern, Agenten oder Vertretern von MACHEREY-NAGEL, mit Ausnahme von schriftlichen Erklärungen, die von einem ordnungsgemäß bevollmächtigten Vertreter von MACHEREY-NAGEL unterzeichnet sind, sind unzulässig; der Kunde darf sich nicht auf sie verlassen und sie sind nicht Teil des Kaufvertrags oder dieser Garantie.

Änderungen der Produktversprechen sind vorbehalten. Wenden Sie sich daher bitte an unseren technischen Kundendienst, um die aktuellsten Informationen über Produkte von MACHEREY-NAGEL zu erhalten. Für allgemeine wissenschaftliche Informationen können Sie sich auch an Ihren Händler vor Ort wenden. Die in der Literatur von MACHEREY-NAGEL erwähnten Anwendungen dienen nur der Information. MACHEREY-NAGEL übernimmt keine Gewähr dafür, dass alle Anwendungen in MACHEREY-NAGEL-Laboratorien mit MACHEREY-NAGEL-Produkten getestet wurden. MACHEREY-NAGEL übernimmt keine Garantie für die Korrektheit dieser Anwendungen.

Zuletzt aktualisiert: Juli 2025/Rev. 04

Grund für die Revision:

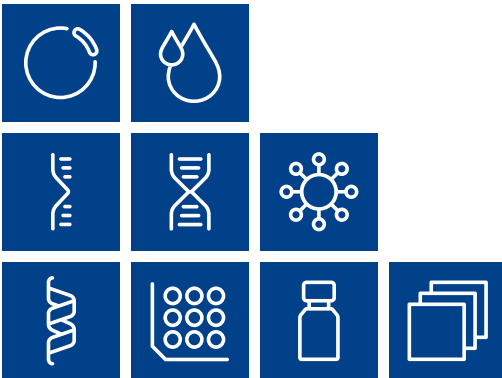
- Hinweis auf neue Sprachen im Benutzerhandbuch.
- Erweiterung des Verwendungszwecks auf virale RNA und virale DNA aus nicht stabilisierten/unbehandelten menschlichen Stuhlproben. Im Ergebnis wurden folgende Abschnitte aktualisiert: Anwendungseinschränkungen des Produkts (2.2), Grundprinzip (2.4), Probenqualität und -vorbereitung (2.6), Analytische und klinische Leistungsfähigkeit (2.9), Vorbereitung der Probenmaterialien (5.1). Zusammenfassung der Änderungen: Die Verwendung von Stuhlproben wurde hinzugefügt und „virale RNA“ wurde zu „virale RNA und virale DNA“ geändert, um den Kontext zu korrigieren.
- Für das Protokoll auf einen Blick (5.2) wurde „RNA binden lassen/eluieren“ zu „Nukleinsäuren binden lassen/eluieren“ geändert.
- Die Kontaktdaten von MACHEREY NAGEL wurden aktualisiert. Die Bestellinformationen wurden aktualisiert und enthalten nun auch NucleoSpin® Dx RNA Blood und NucleoMag® Pathogen Prefilled Plates (RUO). Probenmaterial aktualisiert mit „Stuhlproben“.

Bitte wenden Sie sich an:
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Tel.: +49 24 21 969-333
support@mn-net.com

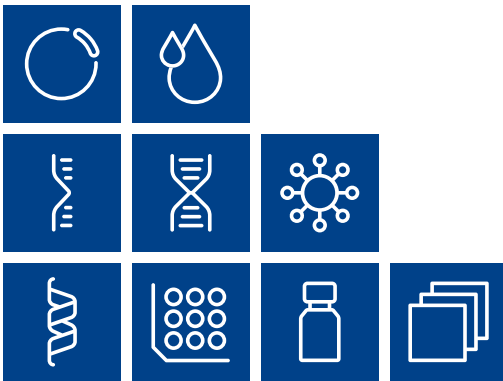
Markenzeichen:

NucleoMag® und NucleoSpin® sind eingetragene Marken der MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Deutschland
KingFisher und AgPath-ID sind Marken von Thermo Fisher Scientific, USA
Te-Shake ist eine Marke der Tecan Group Ltd., Schweiz
epMotion ist eine Marke der Eppendorf AG, Deutschland

Alle verwendeten Namen und Bezeichnungen können Marken, Warenzeichen oder eingetragene Kennzeichen ihrer jeweiligen Eigentümer sein – auch wenn es sich dabei nicht um besondere Bezeichnungen handelt. Die Erwähnung von Produkten und Marken stellt lediglich eine Art von Information dar (d. h. sie verstößt nicht gegen Warenzeichen und Marken und kann nicht als eine Art von Empfehlung oder Bewertung angesehen werden). In Bezug auf diese Produkte oder Dienstleistungen können wir keine Garantien hinsichtlich Auswahl, Leistungsfähigkeit oder Betrieb übernehmen.



Plasmid DNA
Clean up
RNA
DNA
Viral RNA and DNA
Protein
High throughput
Accessories
Auxiliary tools



www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL



MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valenciener Str. 11 · 52355 Düren · Germany

DE +49 24 21 969-0 info@mn-net.com

CH +41 62 388 55 00 sales-ch@mn-net.com

FR +33 388 68 22 68 sales-fr@mn-net.com

US +1 888 321 62 24 sales-us@mn-net.com