

MACHEREY-NAGEL

User manual



Απομόνωση ιικού νουκλεϊκού οξέος

■ NucleoSpin® Dx Virus



In-Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό
Προϊόν



740895.50



MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciennner Str. 11 · 52355 Düren · Γερμανία



50 σκευάσματα



Απρίλιος 2022 / Αναθ. 07

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






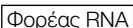



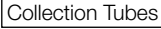
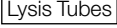
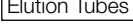

MACHEREY-NAGEL AG
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Switzerland
Tel.: +41 62 388 55 00
E-mail: sales-ch@mn-net.com

Πίνακας περιεχομένων

1	Συστατικά μέρη	4
1.1	Περιεχόμενα του Kit	4
1.2	Αντιδραστήρια, αναλώσιμα και εξοπλισμός που παρέχονται από το χρήστη	5
1.3	Σχετικά με το παρόν εγχειρίδιο χρήσης	6
2	Περιγραφή προϊόντος	7
2.1	Προβλεπόμενη χρήση	7
2.2	Περιορισμοί χρήσης προϊόντος	7
2.3	Ποιοτικός έλεγχος	8
2.4	Εισαγωγή και προδιαγραφές του kit	8
2.5	Αναλυτικές και κλινικές επιδόσεις	10
2.6	Παρατηρήσεις αναφορικά με την ποιότητα και την προετοιμασία των δειγμάτων	12
2.7	Παρατηρήσεις αναφορικά με την έκλυση	12
3	Συνθήκες αποθήκευσης και προετοιμασία διαλυμάτων εργασίας	13
4	Οδηγίες ασφαλείας	15
4.1	Απόρριψη	15
5	Καθαρισμός ιικού νουκλεϊκού οξέος με το NucleoSpin® Dx Virus	16
5.1	Το πρωτόκολλο με μια ματιά	17
5.2	Διαδικασία απομόνωσης ιικού RNA	20
5.3	Διαδικασία απομόνωσης ιικού DNA	22
5.4	Διαδικασία ταυτόχρονης απομόνωσης ιικού RNA και DNA	24
6	Παράρτημα	26
6.1	Αντιμετώπιση προβλημάτων	26
6.2	Απαίτηση κοινοποίησης	27
6.3	Γενική βιβλιογραφία	27
6.4	Πληροφορίες παραγγελιών	27
6.5	Επεξήγηση συμβόλων	28
6.6	Περιορισμός χρήσης προϊόντος / εγγύηση	28

1 Συστατικά μέρη

1.1 Περιεχόμενα του Κιτ

NucleoSpin® Dx Virus		
ΑΝΑΦ.	Σύμβολο	50 σκευάσματα 740895.50
Ρυθμιστικό Διάλυμα Λύσης RAV1		35 mL
Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης RAW		30 mL
Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης RAV3 (Συμπύκνωμα)*		12 mL
H ₂ O ελεύθερο από RNase		13 mL
Ρυθμιστικό Διάλυμα Έκλουσης RE**		13 mL
Φορέας RNA (λυοφιλοποιημένος)*		1 mg
Ρυθμιστικό Διάλυμα Πρωτεΐνης PB		1,8 mL
Πρωτεΐνη Κ (λυοφιλοποιημένη)*		30 mg
Στήλες NucleoSpin® Dx Virus (δακτύλιοι σε σκούρο μπλε - συν Σωληνάρια Συλλογής)		50
Σωληνάρια Συλλογής (2 mL)		4 x 50
Σωληνάρια Λύσης (1,5 mL)		50
Σωληνάρια Έκλουσης (1,5 mL)		50
Εγχειρίδιο χρήσης		1

* Για την προετοιμασία των διαλυμάτων εργασίας και τις συνθήκες φύλαξης δείτε την ενότητα 3.

** Σύνθεση του Ρυθμιστικού διαλύματος Έκλουσης RE: 5 mM Tris/HCl, pH 8,5

1.2 Αντιδραστήρια, αναλώσιμα και εξοπλισμός που παρέχονται από το χρήστη

Αντιδραστήρια

- Αιθανόλη 96 – 100 % (για τη ρύθμιση των συνθηκών δέσμευσης του νουκλεϊκού οξέος και την προετοιμασία του Διαλύματος Πλύσης RAV3)

Αναλώσιμα

- Ρύγχη πιπετών μίας χρήσης (για την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης συνιστώνται ρύγχη πιπετών με φραγμό αερολύματος)

Εξοπλισμός

- Χειροκίνητες πιπέτες
- Φυγόκεντρος για σωληνάρια μικροφυγόκεντρου
- Αναδευτήρας τύπου Vortex
- Θερμικό μπλοκ ή υδατόλουτρο για επώαση στους 70 °C
- Ατομικός προστατευτικός εξοπλισμός (πχ. ποδιά εργαστηρίου, γάντια, γυαλιά)

1.3 Σχετικά με το παρόν εγχειρίδιο χρήσης

Συνιστάται ιδιαίτέρως να διαβάσετε τη λεπτομερή ενότητα πρωτοκόλλου του παρόντος εγχειριδίου χρήσης. Το Πρωτόκολλο με μια ματιά έχει σχεδιαστεί για να χρησιμοποιείται μόνο ως συμπληρωματικό εργαλείο για την ταχεία αναφορά ενώ παράλληλα πραγματοποιείται η διαδικασία καθαρισμού.

Τα εγχειρίδια χρήσης της MACHEREY-NAGEL είναι διαθέσιμα στο διαδίκτυο στη διεύθυνση www.mn-net.com.

Παρακαλώ επικοινωνήστε με την Τεχνική Υπηρεσία για τις πληροφορίες σχετικά με τις αλλαγές στο τρέχον εγχειρίδιο χρήσης σε σύγκριση με προηγούμενες ή επικαιροποιημένες εκδόσεις.

Στοιχεία Επικοινωνίας

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciennner Str. 11
52355 Duren
Γερμανία
Τηλ.: +49 24 21 969-0
Χωρίς χρέωση: 0800 26 16 000 (μόνο για τη Γερμανία)
E-mail: info@mn-net.com

Τεχνική Υποστήριξη Bioanalysis

Τηλ.: +49 24 21 969-270
E-mail: tech-bio@mn-net.com

Benutzerhandbuecher in weiteren Sprachen sind im Download-Bereich auf der Produktseite verfügbare.

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

Los manuales de usuario en otros idiomas estan disponibles en la seccion de descargas de a pagina del producto.



2 Περιγραφή προϊόντος

2.1 Προβλεπόμενη χρήση

Το **NucleoSpin® Dx Virus** είναι ένα κιτ για την απομόνωση ιικών νουκλεϊκών οξέων από φρέσκο και κατεψυγμένο ανθρώπινο ορό και πλάσμα, σταθεροποιημένο είτε με EDTA ή κιτρικό άλας από κοινά συστήματα συλλογής αίματος για την επακόλουθη *in-vitro* ανάλυση. Το προϊόν παρέχει τα καθαρισμένα ιικά νουκλεϊκά οξέα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για την επακόλουθη ανάλυση καθοδικής ροής όπως η (RT)-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή), η qPCR (ποσοτική PCR), η qRT-PCR (ποσοτική RT-PCR) ή η αλληλούχηση με σκοπό τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τις λοιμώξεις με ιούς. Το προϊόν χρησιμοποιείται από επαγγελματίες χρήστες σε διαγνωστικά εργαστήρια.

Το κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** δεν είναι κατάλληλο για αυτοεξέταση ή για εξέταση κοντά στον ασθενή. Ο χρήστης θα πρέπει να διαθέτει εμπειρία σε μοριακές βιολογικές τεχνικές συμπεριλαμβανομένης της εμπειρίας με ορό, πλάσμα και άλλα δυνητικά μολυσματικά υλικά ανθρώπινου δείγματος.

Συνιστάται η χρήση των κατάλληλων μαρτύρων όπως οι εσωτερικοί μάρτυρες, οι μάρτυρες εκχύλισης, οι θετικοί/αρνητικοί μάρτυρες.

2.2 Περιορισμοί χρήσης προϊόντος

Το κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** δεν προορίζεται για χρήση με ανθρώπινο ολικό αίμα, ιστό, δείγματα κοπράνων ή καλλιέργειες κυττάρων.

Η απόδοση του κιτ δεν έχει αξιολογηθεί με άλλα δείγματα υγρού ελεύθερα κυττάρων όπως ούρα ή εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

Επίσης το κιτ δεν προορίζεται για την απομόνωση και τον καθαρισμό των βακτηριακών, μυκητιασικών ή παρασιτικών νουκλεϊκών οξέων των ανθρώπινων δειγμάτων ούτε για την απομόνωση ιικών νουκλεϊκών οξέων από δείγματα ανθρώπινου επιχρίσματος ή άλλα συστήματα συλλογής δείγματος.

Εκτός από τα ανθρώπινα δείγματα με το κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν επίσης και φρέσκα ή κατεψυγμένα ζωικά δείγματα. Στα δείγματα αυτά περιλαμβάνονται, ενδεικτικώς, ορός, πλάσμα ή επιχρίσματα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η σήμανση CE IVD του κιτ δεν ισχύει για τα ζωικά δείγματα αλλά περιορίζεται αποκλειστικά σε ανθρώπινη διαγνωστική χρήση.

2.3 Ποιοτικός έλεγχος

Σύμφωνα με το Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της MACHEREY-NAGEL, κάθε παρτίδα του κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** υποβάλλεται σε δοκιμή ως προς τις προκαθορισμένες προδιαγραφές με σκοπό την εξασφάλιση της σταθερής ποιότητας του προϊόντος.

2.4 Εισαγωγή και προδιαγραφές του κιτ

Το **NucleoSpin® Dx Virus** βασίζεται στην καλά τεκμηριωμένη τεχνολογία μεμβράνης πυριτίου της **NucleoSpin®** και παρέχει έναν εύκολο τρόπο απομόνωσης του ιικού RNA και DNA ταυτόχρονα από 150 µL δειγμάτων ορού ή πλάσματος. Το καθαρισμένο RNA και DNA είναι έτοιμο προς χρήση σε εφαρμογές καθοδικής ροής όπως η RT-PCR ή η PCR.

Η διαδικασία **NucleoSpin® Dx Virus** βασίζεται σε μια σειρά απλών βημάτων:

Αρχικά, τα δείγματα ορού ή πλάσματος λυοφιλοποιούνται παρουσία χαστροπικών αλάτων. Για τον καθαρισμό του ιικού DNA, στην αντίδραση λύσης προστίθεται Πρωτεΐνωση Κ. Το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και η αιθανόλη δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες για τη δέσμευση των νουκλεϊκών οξέων στη μεμβράνη πυριτίου των **Στηλών NucleoSpin® Dx Virus**. Ο Φορέας RNA βελτιώνει τη δέσμευση και ανάκτηση του ιικού RNA και DNA χαμηλής συγκέντρωσης. Οι μολύνσεις (πιθανοί αναστολείς της PCR) όπως άλατα, μεταβολίτες και τα διαλυτά μακρομοριακά κυτταρικά συστατικά αφαιρούνται κατά τα στάδια πλύσης με τα ρυθμιστικά διαλύματα με αιθανόλη RAW και RAV3. Τα νουκλεϊκά οξέα εκλύονται τελικά σε 50 µL ρυθμιστικού διαλύματος χαμηλής περιεκτικότητας σε άλας ή νερό.

Φορέας RNA

Ο Φορέας RNA περιλαμβάνεται με σκοπό τη βέλτιστη απόδοση. Ο Φορέας RNA ενισχύει τη δέσμευση των ιικών νουκλεϊκών οξέων στις Στήλες NucleoSpin και μειώνει τον κίνδυνο αποικοδόμησης του ιικού RNA. Να σημειωθεί ότι τα εκλούσματα του κιτ NucleoSpin Dx Virus περιέχουν τόσο ιικά νουκλεϊκά οξέα όσο και Φορέα RNA, με ποσότητες Φορέα RNA οι οποίες είναι δυνατόν να υπερβαίνουν εκείνες των ιικών νουκλεϊκών οξέων. Συνεπώς, όταν χρησιμοποιείται ο φορέας RNA είναι αδύνατον να ποσοτικοποιηθούν τα νουκλεϊκά οξέα που απομονώνονται με το κιτ με τη χρήση φωτομετρικών ή φθοριομετρικών μεθόδων. Συνιστώνται επομένως, άλλες μέθοδοι ποσοτικοποίησης όπως τα ειδικά συστήματα ποσοτικής PCR ή RT-PCR. Επιπλέον, ο Φορέας RNA, ενδέχεται σε σπάνιες περιπτώσεις να αναστείλει τις αντιδράσεις PCR. Η ποσότητα του Φορέα RNA που προστίθεται μπορεί συνεπώς να βελτιστοποιηθεί προσεκτικά ανάλογα με το μεμονωμένο σύστημα PCR που χρησιμοποιείται.

Προδιαγραφές του κιτ

- Το κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** έχει σχεδιαστεί για την ταχεία παρασκευή του ιικού RNA και DNA υψηλής καθαρότητας (πχ, HCV, HIV, HBV, CMV, H1N1) από πλάσμα και ορό.
- Το **NucleoSpin® Dx Virus** είναι κατάλληλο για δείγματα ορού ή πλάσματος 150 µL.
- Τα ιικά νουκλεϊκά οξέα που απομονώνονται και καθαρίζονται με το **NucleoSpin® Dx Virus** μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις ποιοτικές εφαρμογές (πχ., RT-PCR ή PCR για την εξέταση αίματος) καθώς επίσης και σε ποσοτικές εφαρμογές (πχ,

ανίχνευση ιικού φορτίου μέσω της qPCR) με τη χρήση διαγνωστικών τεχνικών ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων.

- Στο παρόν εγχειρίδιο χρήσης περιλαμβάνονται τα πρωτόκολλα για την απομόνωση του ιικού RNA, του ιικού DNA, και την ταυτόχρονη απομόνωση του ιικού RNA και DNA.
- Τα νουκλεϊκά οξέα που παρασκευάζονται είναι κατάλληλα για εφαρμογές όπως η Αυτοματοποιημένη φθορίζουσα αλληλούχηση DNA, η RT-PCR, ή κάθε είδος ενζυματικής αντίδρασης. Το όριο ανίχνευσης ορισμένων ιών εξαρτάται από τις μεμονωμένες διαδικασίες (πχ. in-house nested (RT-) PCR). Για την ελαχιστοποίηση των παρατυπιών στα διαγνωστικά αποτελέσματα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι κατάλληλοι μάρτυρες στις εφαρμογές καθοδικής ροής (πχ. μάρτυρες εκχύλισης, θετικοί / αρνητικοί μάρτυρες) για την παρακολούθηση της διαδικασίας καθαρισμού, ενίσχυσης και ανίχνευσης.
- Εκτός από τα ανθρώπινα δείγματα με το κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν επίσης και φρέσκα ή κατεψυγμένα ζωικά δείγματα. Στα δείγματα αυτά περιλαμβάνονται, ενδεικτικώς ορός, πλάσμα ή επιχρίσματα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η σήμανση CE IVD του κιτ δεν ισχύει για τα ζωικά δείγματα αλλά περιορίζεται αποκλειστικά σε ανθρώπινη διαγνωστική χρήση.

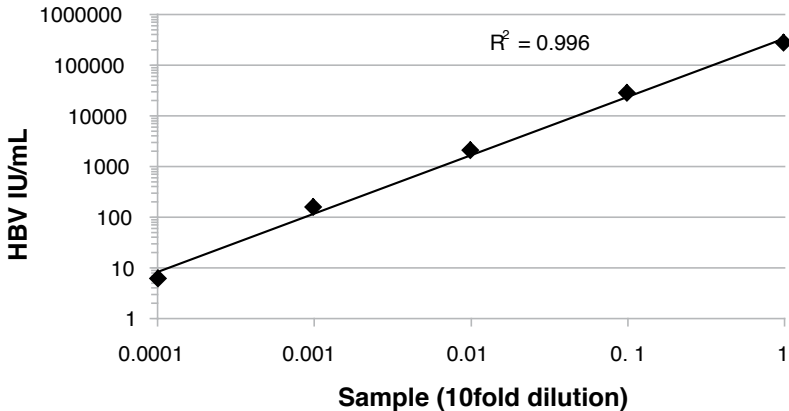
Πίνακας 1: Προδιαγραφές του κιτ με μια ματιά

Παράμετρος	NucleoSpin® Dx Virus
Τεχνολογία	Τεχνολογία μεμβράνης πυριτίου
Υλικό δείγματος	Ορός ή πλάσμα
Όγκος δείγματος	150 µL
Όγκος έκλουσης	50 µL
Χρόνος προετοιμασίας	30 λεπτά / 4 - 6 σκευάσματα
Επεξεργασία	Φυγοκέντριση

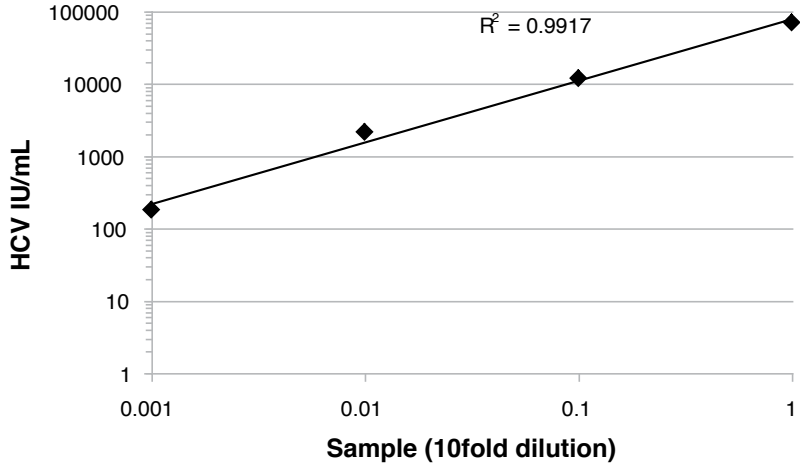
2.5 Αναλυτικές και κλινικές επιδόσεις

Η γραμμική περιοχή της διαδικασίας του **NucleoSpin® Dx Virus** έχει καθοριστεί για το HCV RNA και το HBV DNA σε διαγνωστικές δοκιμές καθοδικής ροής (Εικόνα 1 και Εικόνα 2). Το kit δείχνει τη γραμμικότητα σε αρκετές τάξεις μεγέθους, που περιλαμβάνουν τον σχετικό ιικό τίτλο για διαγνωστικούς σκοπούς. Η επαναληψιμότητα εντός σειρές εξετάστηκε με την RT-qPCR του MS2-RNA και την qPCR του T7-DNA. Για ποσοότητες έξι spike - έκαστη εις τριπλούν, που καλύπτει αρκετές τάξεις μεγέθους - ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) των τιμών-Cp ήταν 0,2–0,9 % για το T7-DNA και 0,6–5,6 % για το MS2-RNA. Η επαναληψιμότητα από σειρά σε σειρά εξετάστηκε σε 2 ανεξάρτητες σειρές. Με έξι δείγματα πλάσματος έκαστη, η διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών Ct των δύο σειρών ήταν 0,1 κύκλος που αντιστοιχεί σε διαφορά 0,4% μεταξύ των μέσων τιμών Ct των δύο σειρών. Η επαναληψιμότητα από παρτίδα σε παρτίδα εξετάστηκε σε τρεις παρτίδες του NucleoSpin Dx Virus. Για κάθε παρτίδα (n=6) απομονώθηκε το gDNA από τα δείγματα πλάσματος. Η μέση τιμή-Ct για τις τρεις παρτίδες που εξετάστηκαν ήταν 27,63 Ct με μια τυπική απόκλιση 0,07 της τιμής-Ct. Σε μια παρεμφερή προσέγγιση, απομονώθηκε ένα MS2-RNA spike από δείγματα πλάσματος και αναλύθηκε με qRT-PCR. Η μέση τιμή-Ct για τις τρεις παρτίδες που εξετάστηκαν ήταν 25,34 Ct με μια τυπική απόκλιση 0,25 της τιμής-Ct.

Η αναπαραγωγιμότητα μεταξύ των χειριστών εξετάστηκε με την RT-qPCR του MS2-RNA. Σε δύο σειρές που πραγματοποιήθηκαν από δύο χειριστές με έξι δείγματα πλάσματος έκαστη, η διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών-Ct των δύο χειριστών ήταν 0,6 κύκλοι που αντιστοιχεί σε διαφορά 3 % μεταξύ των μέσων τιμών-Ct των δύο χειριστών.



Εικόνα 1 Σειριακή αραίωση δείγματος πλάσματος με υψηλό ιικό φορτίο HBV. PCR πραγματικού χρόνου του HBV DNA: Artus RealArt HBV DNA, ποσοτικοποίηση με το Roche LightCycler® 480.



Εικόνα 2 Σειριακή αραίωση δείγματος πλάσματος με υψηλό ιικό φορτίο HCV.

RT-PCR πραγματικού χρόνου του HCV RNA: Artus RealArt HCV RNA, ποσοτικοποίηση με το Roche LightCycler® 480.

Για την αξιολόγηση των κλινικών επιδόσεων απομονώθηκαν ιικά νουκλεϊκά οξέα από τα δείγματα πλάσματος και ενισχύθηκαν σε δοκιμές qPCR και RT-qPCR. Το ιικό φορτίο όπως λαμβάνεται με το NucleoSpin Dx Virus συγκρίθηκε με ένα σύστημα αναφοράς (αυτοματοποιημένο σύστημα απομόνωσης νουκλεϊκού οξέως από την Abbott). Για κάθε ιό αξιολογήθηκαν 8 θετικά και 2 αρνητικά δείγματα καθώς επίσης και ένα 1 θετικός και 1 αρνητικός μάρτυρας. Για τον HBV η διαγνωστική ευαισθησία και η διαγνωστική ειδικότητα ήταν 100 %. Για τον HCV η διαγνωστική ευαισθησία ήταν 89 %, ενώ η διαγνωστική ειδικότητα ήταν 100 %. Για τον HIV η διαγνωστική ευαισθησία ήταν 78 % και η διαγνωστική ειδικότητα ήταν 100 %.

Η *in-vitro* διαγνωστική χρήση του **NucleoSpin® Dx Virus** καταδεικνύεται στις ακόλουθες δημοσιεύσεις:

Raharinosy, V. *et al.* (2019) Fast, Sensitive and Specific Detection of Thailand orthohantavirus and its Variants Using One-Step Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assay. *Viruses*, 11(8), 718.

Kassela, K. *et al.* (2019) Intergenotypic 2k/1b hepatitis C virus recombinants in the East Macedonia and Thrace region of Greece. *Ann Gastroenterol.*, 32(1), 88–92.

Mousavi, S. H. *et al.* (2019) First Report of Prevalence of Blood-Borne Viruses (HBV, HCV, HIV, HTLV-1 and Parvovirus B19) Among Hemophilia Patients in Afghanistan. *Sci Rep.*, 9(1), 7259.

Hesamizadeh, K. *et al.* (2016) Molecular Epidemiology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpes Virus, and Risk Factors in HIV-infected Patients in Tehran, 2014. *Iran Red Crescent Med J.*, 18(11), e32603.

Lescure, F.-X. *et al.* (2020) Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(6), 697.

Thacker, V. V. *et al.* (2020) Rapid endothelialitis and vascular inflammation characterise SARS-CoV-2 infection in a human lung-on-chip model, *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.08.10.243220>, 2020

Gabaro, F. *et al.* (2020) Introductions and early spread of SARS-CoV-2 in France, *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.04.24.059576>

2.6 Παρατηρήσεις αναφορικά με την ποιότητα και την προετοιμασία των δειγμάτων

- Το **NucleoSpin® Dx Virus** είναι κατάλληλο για δείγματα ανθρώπινου ορού ή πλάσματος. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να αποφεύγετε τον καθαρισμό των δειγμάτων με φυγοκέντρηση/ διήθηση πριν από το στάδιο λύσης με το RAV1, καθώς οι ιοί ενδέχεται να σχετίζονται με σωματίδια ή συσσωματώματα.
- Για τον επιτυχημένο καθαρισμό του νουκλεϊκού οξέος, είναι σημαντικό να λαμβάνεται ένα ομοιογενές, διαυγές και μη ιξώδες λύμα δείγματος πριν από τη ρύθμιση των συνθηκών δέσμωσης και τη φόρτωση του δείγματος στη Στήλη **NucleoSpin® Dx Virus**. Ελέγξτε όλα τα λύματα (ιδιαίτερα εκείνα των παλαιών ή κατεψυγμένων δειγμάτων) για ιζήματα. Η επώαση με το Ρυθμιστικό διάλυμα RAV1 μπορεί να παραταθεί με σκοπό τη διάλυση και χώνευση των υπολειμματικών κυτταρικών δομών, των ιζημάτων και των σωματιδίων του ιού. Το RNA, ωστόσο, είναι ευαίσθητο και η παρατεταμένη επώαση μπορεί να προκαλέσει μειωμένες αποδόσεις.

2.7 Παρατηρήσεις αναφορικά με την έκλουση

- Τα καθαρά νουκλεϊκά οξέα εκλύονται τελικά υπό συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος με H₂O ελεύθερο από RNase (pH περίπου 7 – 8) ή με ένα ελαφρώς αλκαλικό Ρυθμιστικό διάλυμα RE (5 mM Tris-HCl, pH 8,5), τα οποία παρέχονται αμφότερα μαζί με το **NucleoSpin® Dx Virus**.
- Το RNA θα πρέπει να εκλύεται με το ελεύθερο από RNase H₂O και το DNA με το Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης RE.
- Για να εκλούσετε μαζί και τους δύο τύπους νουκλεϊκών οξέων, χρησιμοποιήστε το ελεύθερο από RNase H₂O που παρέχεται με το κιτ, προθερμασμένο στους 70 °C.

Αποθήκευση νουκλεϊκών οξέων

Σύσταση:

Βραχυπρόθεσμη αποθήκευση (έως και 24 ώρες): 2–8 °C

Μακροπρόθεσμη αποθήκευση (άνω των 24 ωρών): -20 °C

3 Συνθήκες αποθήκευσης και προετοιμασία διαλυμάτων εργασίας

Προσοχή: Το Ρυθμιστικό διάλυμα RAV1 περιέχει θειοκυανικό γουανιδίνιο και το Ρυθμιστικό Διάλυμα RAW περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη που μπορεί να σχηματίσει ιδιαίτερα δραστικές ενώσεις όταν συνδυάζεται με χλωρίνη (υποχλωριώδες νάτριο). ΜΗΝ προσθέτετε χλωριούχα ή όξινα διαλύματα απευθείας στα απόβλητα παρασκευής δειγμάτων.

- Μετά την παραλαβή του κιτ, ελέγξτε όλα τα συστατικά μέρη για ζημιές. Εάν τα περιεχόμενα του κιτ, όπως οι φιάλες ρυθμιστικού διαλύματος ή οι συσκευασίες κυψέλης έχουν υποστεί ζημιά, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης και εξυπηρέτησης πελατών της MACHEREY-NAGEL, ή με τον τοπικό σας διανομέα.
- Μην χρησιμοποιείτε κατεστραμμένα συστατικά μέρη του κιτ.
- Μετά την άφιξή του, το κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** θα πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου (18–25 °C). ΔΕΝ απαιτείται το άνοιγμα του κιτ κατά την παράδοση και η αφαίρεση μεμονωμένων συστατικών για ξεχωριστή φύλαξη.
- Οι **Στήλες NucleoSpin® Dx Virus** μπορούν να χρησιμοποιηθούν έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο κουτί του κιτ.
- Χρησιμοποιήστε εξοπλισμό χωρίς RNase.

Πριν από την εκκίνηση του πρωτοκόλλου **NucleoSpin® Dx Virus** προετοιμάστε τα ακόλουθα:

- Η **Λυοφιλοποιημένη Πρωτεΐνωση Κ** μπορεί να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου (18–25 °C) έως την ημερομηνία λήξης χωρίς να μειώνεται η απόδοση. Πριν από την πρώτη χρήση του κιτ, προσθέστε την ενδεικνυόμενη ποσότητα **Ρυθμιστικού Διαλύματος Πρωτεΐνωσης PB** για να διαλύσετε τη λυοφιλοποιημένη Πρωτεΐνωση Κ. Η ανασυσταμένη Πρωτεΐνωση Κ θα πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20 °C για έως και 6 μήνες, αλλά μόνο έως την ημερομηνία λήξης.
- Φορέας RNA: Πριν από την πρώτη χρήση, προσθέστε στο φιαλίδιο του **Φορέα RNA** 1 mL **Ρυθμιστικού διαλύματος Λύσης RAV1**. Διαλύστε το φορέα RNA και μεταφέρετε με πιπέτα το διάλυμα και πάλι στο φιαλίδιο του RAV1.
Σημείωση: Λόγω της διαδικασίας παραγωγής και της μικρής ποσότητας του Φορέα RNA που περιέχεται στο φιαλίδιο, ο Φορέας RNA ενδέχεται να μην είναι ορατός.

Το Ρυθμιστικό διάλυμα Λύσης RAV1 συμπεριλαμβανομένου του Φορέα RNA μπορεί να φυλάσσεται στους 4 °C για έως και 4 εβδομάδες. Η φύλαξη στους 4 °C ή χαμηλότερη μπορεί να προκαλέσει καθίζηση άλατος. Εάν τα ιζήματα είναι ορατά, βεβαιωθείτε ότι έχετε διαλύσει όλα τα ιζήματα πριν από τη χρήση θερμαίνοντάς τα στους 40–60 °C για μέγιστο χρονικό διάστημα 5 λεπτών. Ο Φορέας RNA που διαλύεται στο Ρυθμιστικό διάλυμα RAV1 και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -20 °C είναι σταθερός για τουλάχιστον ένα έτος.

Μην προθερμαίνετε το Ρυθμιστικό διάλυμα RAV1 που περιέχει Φορέα RNA περισσότερες από 4 φορές! Η συχνή θέρμανση, οι θερμοκρασίες > 80 °C και η παρατεταμένη θερμική επώαση θα επιταχύνουν την αποικοδόμηση του Φορέα RNA.

- **Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης RAV3:** Προσθέστε την ενδεικνυόμενη ποσότητα αιθανόλης (96–100 %), (βλ. τον πίνακα παρακάτω ή επί του φιαλιδίου) στο **Συμπύκνωμα Ρυθμιστικού Διαλύματος Πλύσης RAV3**. Σημειώστε την ετικέτα του φιαλιδίου για να υποδείξετε ότι προστέθηκε η αιθανόλη. Φυλάξτε το Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης RAV3 σε

θερμοκρασία δωματίου. Το Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης RAV3 μπορεί να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου (18–25 °C) για έως και ένα έτος αλλά μόνο έως την ημερομηνία λήξης.

NucleoSpin® Dx Virus	
ΑΝΑΦ.	50 σκευάσματα 740895.50
Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης RAV3 (Συμπύκνωμα)	12 mL Προσθέστε 48 mL αιθανόλης
Πρωτεΐνωση Κ	30 mg Προσθέστε 1,35 mL Ρυθμιστικού Διαλύματος Πρωτεΐνωσης ΡΒ

4 Οδηγίες ασφαλείας

Κατά την εργασία με το κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** φοράτε τον κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό (πχ. ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά). Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά Δελτία Δεδομένων Ασφαλείας Υλικού (MSDS διαθέσιμα στο διαδίκτυο στη διεύθυνση <http://www.mn-net.com/msds>).



Προσοχή: Η υδροχλωρική γουανιδίνη στο ρυθμιστικό διάλυμα RAW και το θειοκυανικό γουανιδίνιο στο Ρυθμιστικό διάλυμα RAW1 μπορούν να σχηματίσουν εξαιρετικά δραστικές ενώσεις όταν συνδυαστούν με χλώριο! Συνεπώς, μην προσθέτετε χλωριούχα ή όξινα διαλύματα απευθείας στα απόβλητα παρασκευής δειγμάτων.

Τα απόβλητα που παράγονται από το κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** δεν έχουν εξεταστεί για υπολειμματικά μολυσματικά υλικά. Η επιμόλυνση των υγρών αποβλήτων με υπολειμματικά μολυσματικά υλικά είναι εξαιρετικά απίθανη λόγω της ιδιαίτερα μετουσιωτικής επεξεργασίας του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και της Πρωτεϊνάσης K, αλλά δεν μπορεί να αποκλειστεί τελείως. Για το λόγο αυτό, τα υγρά απόβλητα θα πρέπει να θεωρούνται μολυσματικά και ο χειρισμός και η απόρριψή τους θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς ασφαλείας.

4.1 Απόρριψη

Απορρίψτε τα επικίνδυνα, μολυσματικά ή βιολογικά επιμολυσμένα υλικά με ασφαλή και αποδεκτό τρόπο και σύμφωνα με όλες τις τοπικές και ρυθμιστικές απαιτήσεις.

5 Καθαρισμός ιικού νουκλεϊκού οξέος με το NucleoSpin® Dx Virus

Οι παρακάτω διαδικασίες παρέχουν οδηγίες για την επεξεργασία ενός μόνο δείγματος πλάσματος ή ορού. Ωστόσο, είναι δυνατή η ταυτόχρονη επεξεργασία αρκετών δειγμάτων. Ο αριθμός εξαρτάται από τη χωρητικότητα της μικροφυγόκεντρου που χρησιμοποιείται.

Πριν ξεκινήσετε την προετοιμασία:

- Βεβαιωθείτε ότι το Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης RAV3 και η Πρωτεΐνάση K προετοιμάστηκαν σύμφωνα με την ενότητα 3.
- Ελέγξτε ότι ο Φορέας RNA έχει διαλυθεί σε Ρυθμιστικό διάλυμα Λύσης RAV1 σύμφωνα με την ενότητα 3.
- Βεβαιωθείτε ότι διατίθεται αιθανόλη 96 – 100 % (μετουσιωμένη ή μη-μετουσιωμένη) για τη ρύθμιση των συνθηκών δέσμευσης του νουκλεϊκού οξέος.
- Ρυθμίστε έναν επωαστήρα (πχ.θερμικό μπλοκ) ή υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 70 °C.
- Αφήστε τα δείγματα πλάσματος/ορού να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου (18 – 25 °C). Βεβαιωθείτε ότι τα δείγματα έχουν αναμειχθεί καλά.
- Εάν έχει δημιουργηθεί ίζημα στο Ρυθμιστικό Διάλυμα Λύσης RAV1 ή το Ρυθμιστικό Διάλυμα RAW, επώαστε το ρυθμιστικό διάλυμα στους 40 – 60 °C έως ότου διαλυθεί το ίζημα.
- Γενικά, μην αναμιγνύετε αντιδραστήρια και στήλες από διαφορετικά κιτ και παρτίδες κιτ.
- Θερμάνετε το ελεύθερο από RNase H₂O/ Ρυθμιστικό διάλυμα Έκλουσης στους 70 °C για την τελική έκλυση των νουκλεϊκών οξέων.
- Μην προσθέτετε διάλυμα Πρωτεΐνάσης K απευθείας στο Ρυθμιστικό Διάλυμα Λύσης RAV1. Το δείγμα θα πρέπει να συνδυάζεται με το Ρυθμιστικό διάλυμα Λύσης RAV1 πριν από την προσθήκη της Πρωτεΐνάσης K.
- Όλα τα βήματα φυγοκέντρησης θα πρέπει να εκτελούνται σε θερμοκρασία δωματίου (18 – 25 °C).

5.1 Το πρωτόκολλο με μια ματιά

Συμπληρωματική επισκόπηση πρωτοκόλλου:

Πριν να ξεκινήσετε τη διαδικασία, διαβάστε προσεκτικά το λεπτομερές πρωτόκολλο (ενότητα 5.2.5.4).

Σημείωση: Τα πρωτόκολλα διαφέρουν μόνο στο βήμα λύσης της Πρωτεΐνης Κ (βήμα 3) και στο βήμα έκλουσης (βήμα 24).

		Διαδικασία απομόνωσης ιικού RNA (ενότητα 5.2)	Διαδικασία απομόνωσης ιικού DNA (ενότητα 5.3)	Διαδικασία απομόνωσης ιικού RNA + DNA (ενότητα 5.4)
Παροχή δείγματος, λύση ιών, διαυγές λύμα	1	150 µL δείγματος σε Σωληνάρια Λύσης	150 µL δείγματος σε Σωληνάρια Λύσης	150 µL δείγματος σε Σωληνάρια Λύσης
	2	600 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAV1 που περιέχει Φορέα RNA	600 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAV1 που περιέχει Φορέα RNA	600 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAV1 που περιέχει Φορέα RNA
	3	<i>Σημείωση: Για την απομόνωση του ιικού RNA μόνο δε χρησιμοποιείται Πρωτεΐνη Κ</i>	20 µL Πρωτεΐνης Κ (Επιβάστε τουλάχιστον 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου)	20 µL Πρωτεΐνης Κ (Επιβάστε τουλάχιστον 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου)
	4	Αναμειξτε την πιπέτα πάνω και κάτω και αναδεύστε καλά	Αναμειξτε την πιπέτα πάνω και κάτω και αναδεύστε καλά	Αναμειξτε την πιπέτα πάνω και κάτω και αναδεύστε καλά
	5	Επιβάστε στους 70 °C για 5 λεπτά	Επιβάστε στους 70 °C για 5 λεπτά	Επιβάστε στους 70 °C για 5 λεπτά
	6	Σύντομη φυγοκέντριση για να καθαρίσει το καπάκι	Σύντομη φυγοκέντριση για να καθαρίσει το καπάκι	Σύντομη φυγοκέντριση για να καθαρίσει το καπάκι
Ρύθμιση συνθηκών δέσμευσης	7	600 µL αιθανόλη	600 µL αιθανόλη	600 µL αιθανόλη
	8	Αναμειξτε με ανάδευση (10 – 15 δευτ.)	Αναμειξτε με ανάδευση (10 – 15 δευτ.)	Αναμειξτε με ανάδευση (10 – 15 δευτ.)
Δέσμευση RNA/DNA	9	Τοποθετήστε 700 µL λύματος στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus	Τοποθετήστε 700 µL λύματος στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus	Τοποθετήστε 700 µL λύματος στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus

	10	8.000 x g, 1 λεπτό	8.000 x g, 1 λεπτό	8.000 x g, 1 λεπτό
	11	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε νέο Σωληνάριο Συλλογής	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε νέο Σωληνάριο Συλλογής	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε νέο Σωληνάριο Συλλογής
	12	Τοποθετήστε το υπολειμματικό λύμα (περίπου 650 µL) στη στήλη	Τοποθετήστε το υπολειμματικό λύμα (περίπου 650 µL) στη στήλη	Τοποθετήστε το υπολειμματικό λύμα (περίπου 650 µL) στη στήλη
	13	8.000 x g, 1 λεπτό	8.000 x g, 1 λεπτό	8.000 x g, 1 λεπτό
	14	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε νέο Σωληνάριο Συλλογής	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε νέο Σωληνάριο Συλλογής	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε νέο Σωληνάριο Συλλογής
Πλύση μεμβράνης πυριτίου	15	500 µL RAW	500 µL RAW	500 µL RAW
	16	8.000 x g, 1 λεπτό	8.000 x g, 1 λεπτό	8.000 x g, 1 λεπτό
	17	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε νέο Σωληνάριο Συλλογής	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε νέο Σωληνάριο Συλλογής	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε νέο Σωληνάριο Συλλογής
	18	600 µL RAV3	600 µL RAV3	600 µL RAV3
	19	8.000 x g, 1 λεπτό	8.000 x g, 1 λεπτό	8.000 x g, 1 λεπτό
	20	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε νέο Σωληνάριο Συλλογής	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε νέο Σωληνάριο Συλλογής	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε νέο Σωληνάριο Συλλογής
	21	200 µL RAV3	200 µL RAV3	200 µL RAV3
	22	11.000 x g, 3 λεπτά	11.000 x g, 3 λεπτά	11.000 x g, 3 λεπτά
Έκλυση RNA/DNA	23	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε Σωληνάριο Έκλυσης	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε Σωληνάριο Έκλυσης	Μεταφέρετε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε Σωληνάριο Έκλυσης

24	50 μL H₂O ελεύθερο από RNase (70 °C), Επώαστε 1–2 λεπτά	50 μL Ρυθμιστικό διάλυμα RE (70 °C), Επώαστε 1–2 λεπτά	50 μL H₂O ελεύθερο από RNase (70 °C), Επώαστε 1–2 λεπτά
25	11.000 x g, 1 λεπτό	11.000 x g, 1 λεπτό	11.000 x g, 1 λεπτό

5.2 Διαδικασία απομόνωσης ιικού RNA

- 1 Τοποθετήστε **150 µL δείγματος** σε ένα Σωληνάριο Λύσης (1,5 mL, παρέχεται).
 - 2 Προσθέστε **600 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAV1** που περιέχει Φορέα RNA στο Σωληνάριο Λύσης.
 - 3 *Σημείωση: Για την απομόνωση του ιικού RNA μόνο δε χρησιμοποιείται Πρωτεΐνάση K.*
 - 4 Αναμείξτε την πιπέτα πάνω και κάτω και αναδεύστε καλά.
 - 5 Επώαστε για **5 λεπτά** στους **70 °C**.
 - 6 **Φυγοκεντρίστε σύντομα** το Σωληνάριο Λύσης (περίπου 1 δευτ στα 2.000 x g) για να απομακρύνετε τα σταγονίδια από το καπάκι (μόνο σύντομη φυγοκέντρωση).
-
- 7 Προσθέστε στο διαυγές λύμα **600 µL αιθανόλης** (96–100 %).
 - 8 Αναμείξτε με ανάδευση (10–15 δευτ.).
-
- 9 Τοποθετήστε προσεκτικά **700 µL λύματος** στη **Στήλη NucleoSpin® Dx Virus** που είναι τοποθετημένη σε Σωληνάριο Συλλογής και κλείστε το καπάκι.
 - 10 **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό** στα **8.000 x g**.
 - 11 Τοποθετήστε τη **Στήλη NucleoSpin® Dx Virus** σε ένα νέο Σωληνάριο Συλλογής (2 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
 - 12 Τοποθετήστε το **υπολειμματικό λύμα** (περίπου. 650 µL) στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus και κλείστε το καπάκι.
 - 13 **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό** στα **8.000 x g**.
 - 14 Τοποθετήστε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε ένα νέο Σωληνάριο Συλλογής (2 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
-
- 15 Προσθέστε **500 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAW** στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus.
 - 16 **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό** στα **8.000 x g**.
 - 17 Τοποθετήστε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε ένα νέο Σωληνάριο Συλλογής (2 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
 - 18 Προσθέστε **600 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAV3** στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus.
 - 19 **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό** στα **8.000 x g**.
 - 20 Τοποθετήστε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε ένα νέο Σωληνάριο Συλλογής (2 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
 - 21 Προσθέστε **200 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAV3** στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus.
 - 22 **Φυγοκεντρίστε για 3 λεπτά** στα **11.000 x g**.
-

- 23 Τοποθετήστε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε ένα νέο Σωληνάριο Έκλουσης (1,5 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
 - 24 Προσθέστε **50 μL H₂O ελεύθερο από RNase** (προθερμασμένο στους 70 °C) και επώαστε 1–2 λεπτά.
 - 25 **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό** στα **11.000 x g** ώστε να γίνει έκλυση του νουκλεϊκού οξέος από τη στήλη.
-

5.3 Διαδικασία απομόνωσης ιικού DNA

- 1 Τοποθετήστε **150 µL δείγματος** σε ένα Σωληνάριο Λύσης (1,5 mL, παρέχεται).
 - 2 Προσθέστε **600 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAV1** που περιέχει Φορέα RNA στο Σωληνάριο Λύσης.
 - 3 Προσθέστε **20 µL Πρωτεϊνάσης K** στο Σωληνάριο Λύσης.
Σημείωση: Η Πρωτεϊνάση K δεν είναι απαραίτητη για τη λύση των ιών του DNA.
 - 4 Αναμείξτε την πιπέτα πάνω και κάτω και αναδεύστε καλά.
Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι το μείγμα επώαστηκε τουλάχιστον 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου πριν να ξεκινήσετε τη θερμική επώαση.
 - 5 Επώαστε για **5 λεπτά** στους **70 °C**.
 - 6 **Φυγοκεντρίστε σύντομα** το Σωληνάριο Λύσης (περίπου 1 δευτ στα 2.000 x g) για να απομακρύνετε τα σταγονίδια από το καπάκι (μόνο σύντομη φυγοκέντρωση).
-
- 7 Προσθέστε στο διαυγές λύμα **600 µL αιθανόλης** (96–100 %).
 - 8 Αναμείξτε με ανάδευση (10–15 δευτ.).
-
- 9 Τοποθετήστε προσεκτικά **700 µL λύματος** στη **Στήλη NucleoSpin® Dx Virus** που είναι τοποθετημένη σε Σωληνάριο Συλλογής και κλείστε το καπάκι.
 - 10 **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό** στα **8.000 x g**.
 - 11 Τοποθετήστε τη **Στήλη NucleoSpin® Dx Virus** σε ένα νέο Σωληνάριο Συλλογής (2 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
 - 12 Τοποθετήστε το **υπολειμματικό λύμα** (περίπου. 650 µL) στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus και κλείστε το καπάκι.
 - 13 **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό** στα **8.000 x g**.
 - 14 Τοποθετήστε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε ένα νέο Σωληνάριο Συλλογής (2 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
-
- 15 Προσθέστε **500 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAW** στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus.
 - 16 **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό** στα **8.000 x g**.
 - 17 Τοποθετήστε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε ένα νέο Σωληνάριο Συλλογής (2 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
 - 18 Προσθέστε **600 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAV3** στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus.
 - 19 **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό** στα **8.000 x g**.
 - 20 Τοποθετήστε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε ένα νέο Σωληνάριο Συλλογής (2 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.

- 21** Προσθέστε **200 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAV3** στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus.
- 22** **Φυγοκεντρίστε για 3 λεπτά στα 11.000 x g.**
-
- 23** Τοποθετήστε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε ένα νέο Σωληνάριο Έκλουσης (1,5 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
- 24** Προσθέστε **50 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RE** (προθερμασμένο στους 70 °C) και επώαστε 1–2 λεπτά.
- 25** **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό στα 11.000 x g** ώστε να γίνει έκλυση του νουκλεϊκού οξέος από τη στήλη.
-

5.4 Διαδικασία ταυτόχρονης απομόνωσης ιικού RNA και DNA

- 1 Τοποθετήστε **150 µL δείγματος** σε ένα Σωληνάριο Λύσης (1,5 mL, παρέχεται).
 - 2 Προσθέστε **600 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAV1** που περιέχει Φορέα RNA στο Σωληνάριο Λύσης.
 - 3 Προσθέστε **20 µL Πρωτεΐνάσης K** στο Σωληνάριο Λύσης.
Σημείωση: Η Πρωτεΐνάση K δεν είναι απαραίτητη για τη λύση των ιών του DNA.
 - 4 Αναμείξτε την πιπέτα πάνω και κάτω και αναδεύστε καλά.
Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι το μείγμα επώαστηκε τουλάχιστον 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου πριν να ξεκινήσετε τη θερμική επώαση.
 - 5 Επώαστε για **5 λεπτά** στους **70 °C**.
 - 6 **Φυγοκεντρίστε σύντομα** το Σωληνάριο Λύσης (περίπου 1 δευτ στα 2.000 x g) για να απομακρύνετε τα σταγονίδια από το καπάκι (μόνο σύντομη φυγοκέντρωση).
-
- 7 Προσθέστε στο διαυγές λύμα **600 µL αιθανόλης** (96 – 100 %).
 - 8 Αναμείξτε με ανάδευση (10 – 15 δευτ.).
-
- 9 Τοποθετήστε προσεκτικά **700 µL λύματος** στη **Στήλη NucleoSpin® Dx Virus** που είναι τοποθετημένη σε Σωληνάριο Συλλογής και κλείστε το καπάκι.
 - 10 **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό** στα **8.000 x g**.
 - 11 Τοποθετήστε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε ένα νέο Σωληνάριο Συλλογής (2 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
 - 12 Τοποθετήστε το **υπολειμματικό λύμα** (περίπου. 650 µL) στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus και κλείστε το καπάκι.
 - 13 **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό** στα **8.000 x g**.
 - 14 Τοποθετήστε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε ένα νέο Σωληνάριο Συλλογής (2 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
-
- 15 Προσθέστε **500 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAW** στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus.
 - 16 **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό** στα **8.000 x g**.
 - 17 Τοποθετήστε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε ένα νέο Σωληνάριο Συλλογής (2 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
 - 18 Προσθέστε **600 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAV3** στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus.
 - 19 **Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό** στα **8.000 x g**.
 - 20 Τοποθετήστε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε ένα νέο Σωληνάριο Συλλογής (2 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
 - 21 Προσθέστε **200 µL Ρυθμιστικού διαλύματος RAV3** στη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus.

- 22 Φυγοκεντρίστε για 3 λεπτά στα 11.000 x g.**
-
- 23** Τοποθετήστε τη Στήλη NucleoSpin® Dx Virus σε ένα νέο Σωληνάριο Έκλουσης (1,5 mL, παρέχεται) και απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής με ροή από το προηγούμενο βήμα.
- 24** Προσθέστε **50 µL H₂O ελεύθερο από RNase** (προθερμασμένο στους 70 °C) και επώαστε 1–2 λεπτά.
- 25 Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό στα 11.000 x g** ώστε να γίνει έκλυση του νουκλεϊκού οξέος από τη στήλη.
-

6 Παράρτημα

6.1 Αντιμετώπιση προβλημάτων

Πρόβλημα	Πιθανή αιτία και υποδείξεις
Μικρές ποσότητες ή απουσία ιικών νουκλεϊκών οξέων από το έκλουσμα	<i>Χαμηλό ιικό φορτίο στο δείγμα</i> <ul style="list-style-type: none">• Η απόδοση του νουκλεϊκού οξέος εξαρτάται από το ιικό φορτίο του δείγματος.
	<i>Προβλήματα με τον Φορέα RNA</i> <ul style="list-style-type: none">• Δεν προστέθηκε Φορέας RNA.• Δείτε τις παρατηρήσεις αναφορικά με τη φύλαξη του Ρυθμιστικού διαλύματος RAV1 με Φορέα RNA (ενότητα 3).
	<i>Ενδέχεται να είναι απαραίτητη η πέψη της Πρωτεΐνης K</i> <ul style="list-style-type: none">• Επιλέξτε το κατάλληλο πρωτόκολλο για την απομόνωση του ιικού RNA ή του ιικού DNA, βλ. ενότητα 5.1.
Προβλήματα με την επακόλουθη ανίχνευση	<i>Υποβαθμισμένα ιικά νουκλεϊκά οξέα</i> <ul style="list-style-type: none">• Τα δείγματα θα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία αμέσως. Εξασφαλίστε τις κατάλληλες συνθήκες φύλαξης μέχρι την επεξεργασία.• Βεβαιωθείτε ότι όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα έχουν προετοιμαστεί και αποθηκευτεί σωστά. Σε περίπτωση αμφιβολίας, χρησιμοποιήστε νέα κλάσματα του ρυθμιστικού διαλύματος RAV1, του Φορέα RNA και του Ρυθμιστικού διαλύματος Έκλυσης RE.
	<i>Μειωμένη ευαισθησία</i> <ul style="list-style-type: none">• Αλλάξτε τον όγκο του εκλούσματος που προστίθεται στην PCR/RT-PCR. <i>Μεταφορά αιθανόλης</i> <ul style="list-style-type: none">• Παρατείνετε το βήμα φυγοκέντρησης (βήμα 22) προκειμένου να αφαιρεθεί πλήρως το Ρυθμιστικό διάλυμα RAV3.

Παρακαλούμε επικοινωνήστε:
MACHEREY-NAGEL Γερμανία
Τηλ.: +49 (0) 24 21 969 270
e-mail: TECH-BIO@mn-net.com

6.2 Απαιτήση κοινοποίησης

Παρακαλώ να σημειωθεί ότι τυχόν σοβαρά περιστατικά που προκύπτουν σε σχέση με το προϊόν θα πρέπει να αναφέρονται αμέσως στον κατασκευαστή και στην αρμόδια αρχή του ευρωπαϊκού κράτους μέλους στο οποίο συνέβη το περιστατικό. Ευρωπαϊκά σημεία επαφής φαρμακοεπαγρύπνησης: https://ec.europa.eu/health/md_sector/contact_en

6.3 Γενική βιβλιογραφία

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

Sawoo, O. *et al.* (2014) Cleavage of Hemagglutinin-Bearing Lentiviral Pseudotypes and Their Use in the Study of Influenza Virus Persistence. PLoS One. 9(8), e106192. Δημοσιεύτηκε ηλεκτρονικά στις 28 Αυγ. 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0106192.











Sundarrajan S. *et al.* (2018) Addressing false negatives in viral diagnostic polymerase chain reactions: A new approach. International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research, IJAMBR 6, 32 – 49.

6.4 Πληροφορίες παραγγελιών

Προϊόν	ΑΝΑΦ.	Συσκευασία με
Κιτ με σήμανση CE-IVD		
NucleoSpin® Dx Virus	740895.50	50
NucleoSpin® Dx Blood	740899.50/.250	50/250
Κιτ για ερευνητικούς σκοπούς		
NucleoSpin® Virus	740983.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® RNA Virus F	740958	25
NucleoSpin® totalRNA FFPE XS	740969.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® totalRNA FFPE	740982.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® DNA FFPE XS	740980.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® Blood	740951.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® Tissue	740952.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® Tissue XS	740901.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® miRNA	740971.10/.50/.250	10/50/250
Πρωτεΐνωση K	740506	100 mg
Σωληνάρια Συλλογής (2 mL)	740600	1000

Για πιο λεπτομερείς πληροφορίες του προϊόντος επισκεφτείτε τη διεύθυνση www.mn-net.com.

6.5 Επεξήγηση συμβόλων

 Αριθμός καταλόγου	 Περιεχόμενο επαρκές για < n> εξετάσεις
 Αναγνωριστικό παρτίδας	 Επιτρεπόμενο εύρος θερμοκρασίας αποθήκευσης
 Κατασκευαστής	 Ημερομηνία λήξης
 <i>In-vitro</i> διαγνωστικά προϊόντα	 Προσοχή: Περαιτέρω πληροφορίες στο εγχειρίδιο χρήσης
 Παρακαλώ διαβάστε τις οδηγίες χρήσης	 Μην επαναχρησιμοποιείτε

6.6 Περιορισμός χρήσης προϊόντος / εγγύηση

Το κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** είναι ένα γενικό σύστημα για την απομόνωση και τον καθαρισμό των ιικών νουκλεϊκών οξέων από δείγματα ανθρώπινου πλάσματος ή ορού για τους επακόλουθους *in-vitro* διαγνωστικούς σκοπούς.

Το κιτ είναι σχεδιασμένο για χρήση σε εφαρμογές καθοδικής ροής που χρησιμοποιούν την ενζυμική ενίσχυση και ανίχνευση του RNA και DNA (πχ. RT-PCR, PCR).

Οποιοδήποτε και όλα τα διαγνωστικά αποτελέσματα που παράγονται χρησιμοποιώντας τα ιικά νουκλεϊκά οξέα που απομονώθηκαν με το κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** σε συνδυασμό με μια διαγνωστική δοκιμή θα πρέπει να ερμηνεύονται σε σχέση με τα πρόσθετα κλινικά ή εργαστηριακά ευρήματα.

Το Κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** δεν παρέχει διαγνωστικό αποτέλεσμα. Ο χρήστης είναι αποκλειστικά υπεύθυνος να χρησιμοποιεί και να επικυρώνει το κιτ σε συνδυασμό με την *in-vitro* διαγνωστική δοκιμή καθοδικής ροής. MONO τα προϊόντα της MACHEREY-NAGEL που φέρουν την ειδική σήμανση IVD είναι κατάλληλα για *in-vitro*-διαγνωστική χρήση.

Για οδηγίες ασφαλείας ανατρέξτε στο αντίστοιχο κεφάλαιο του εγχειριδίου χρήσης. Το κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** θα χρησιμοποιείται αποκλειστικά σε ένα επαρκές περιβάλλον δοκιμών, πχ. ένα κατάλληλο εργαστηριακό περιβάλλον. Ο αντίστοιχος χρήστης είναι υπεύθυνος για οποιαδήποτε και όλες τις ζημιές που προκύπτουν από την εφαρμογή του κιτ **NucleoSpin® Dx Virus** για χρήση που αποκλίνει από την προβλεπόμενη όπως καθορίζεται στο εγχειρίδιο χρήσης.

Το παρόν προϊόν της MACHEREY-NAGEL αποστέλλεται με την τεκμηρίωση που αναφέρει τις προδιαγραφές και τις λοιπές τεχνικές πληροφορίες. Η MACHEREY-NAGEL εγγυάται την ικανοποίηση των αναφερόμενων προδιαγραφών. Η μοναδική υποχρέωση της MACHEREY-NAGEL και το μόνο ένδικο μέσο του πελάτη περιορίζεται στην δωρεάν αντικατάσταση των προϊόντων σε περίπτωση αδυναμίας των προϊόντων να αποδώσουν σύμφωνα με την εγγύηση. Συμπληρωματική αναφορά γίνεται στους γενικούς επιχειρηματικούς όρους και προϋποθέσεις της MACHEREY-NAGEL, που είναι τυπωμένες στον τιμοκατάλογο. Παρακαλώ επικοινωνήστε μαζί μας εάν επιθυμείτε ένα επιπλέον αντίγραφο.

Δεν υπάρχει καμία εγγύηση κα η MACHEREY-NAGEL δεν ευθύνεται για ζημιές ή ελαττώματα που προκύπτουν κατά την αποστολή και το χειρισμό (η ασφάλιση της μεταφοράς για τους πελάτες αποκλείεται), ή λόγω ατυχήματος ή λανθασμένης ή ακατάλληλης χρήσης του προϊόντος αυτού, για ελαττώματα σε προϊόντα ή συστατικά μέρη που δεν κατασκευάζονται από την MACHEREY-NAGEL, ή για ζημιές που προκύπτουν από αυτά τα συστατικά μέρη ή προϊόντα άλλου κατασκευαστή εκτός της MACHEREY-NAGEL. Η MACHEREY-NAGEL δεν παρέχει καμία άλλη εγγύηση οποιουδήποτε είδους, και ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΑΠΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΚΑΙ ΕΞΑΙΡΕΙ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΑΛΛΕΣ ΕΓΓΥΗΣΕΙΣ ΚΑΘΕ ΕΙΔΟΥΣ Ή ΦΥΣΗΣ, ΑΜΕΣΗ Ή ΕΜΜΕΣΗ, ΡΗΤΗ Ή ΣΙΩΠΗΡΗ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ ΧΩΡΙΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑ, ΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΤΗΤΑ, ΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΓΙΑ ΕΝΑ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟ ΣΚΟΠΟ Ή ΧΡΗΣΗ, ΕΜΠΟΡΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑ, ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ Ή ΟΠΟΙΟΔΗΠΟΤΕ ΑΛΛΟ ΖΗΤΗΜΑ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ MACHEREY-NAGEL. Η MACHEREY-NAGEL δεν ευθύνεται σε καμία περίπτωση για οποιεσδήποτε αξιώσεις για τυχόν ζημιές, είτε άμεσες, έμμεσες, τυχαίες, αντισταθμιστικές, προβλέψιμες, παρεπόμενες ή ειδικές (συμπεριλαμβανομένης ενδεικτικά της απώλειας χρήσης, εσόδων ή κέρδους), είτε βασίζονται σε εγγύηση, σύμβαση, αδικοπραξία (συμπεριλαμβανομένης της αμέλειας) ή αντικειμενική ευθύνη που προκύπτει σε σχέση με την πώληση ή την αδυναμία των προϊόντων της MACHEREY-NAGEL να αποδώσουν σύμφωνα με τις αναφερόμενες προδιαγραφές. Η παρούσα εγγύηση είναι αποκλειστική και η MACHEREY-NAGEL δεν παρέχει καμία άλλη εγγύηση ρητή ή σιωπηρή. Η εγγύηση που παρέχεται στο παρόν και τα δεδομένα, οι προδιαγραφές και οι περιγραφές του προϊόντος αυτού της MACHEREY-NAGEL αναφέρονται στους έντυπους καταλόγους της MACHEREY-NAGEL και τα έγγραφα του προϊόντος αποτελούν τις μόνες δηλώσεις της MACHEREY-NAGEL αναφορικά με το προϊόν και την εγγύηση. Δεν επιτρέπεται καμία άλλη δήλωση ή παρουσίαση, έγγραφη ή προφορική, από τους υπαλλήλους, αντιπροσώπους ή εκπροσώπους της MACHEREY-NAGEL, με εξαίρεση τις έγγραφες δηλώσεις που υπογράφονται από έναν δεόντως εξουσιοδοτημένο υπάλληλο της MACHEREY-NAGEL. Δε θα πρέπει ο πελάτης να βασίζεται σε αυτές και δεν αποτελούν μέρος της σύμβασης πώλησης ή της παρούσας εγγύησης.

Οι αξιώσεις προϊόντος υπόκεινται σε αλλαγή. Επικοινωνήστε με την Ομάδα Τεχνικής Υπηρεσίας μας για τις πιο επικαιροποιημένες πληροφορίες σχετικά με τα προϊόντα της MACHEREY-NAGEL. Μπορείτε επίσης να επικοινωνήσετε με τον τοπικό σας διανομέα για γενικές επιστημονικές πληροφορίες. Οι εφαρμογές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία της MACHEREY-NAGEL παρέχονται μόνο για σκοπούς πληροφόρησης. Η MACHEREY-NAGEL δεν εγγυάται ότι έχουν δοκιμαστεί όλες οι εφαρμογές στα εργαστήριά της με χρήση των προϊόντων της MACHEREY-NAGEL. Η MACHEREY-NAGEL δεν εγγυάται την ορθότητα οποιωνδήποτε εξ αυτών των εφαρμογών.

Τελευταία ενημέρωση: Απρίλιος 2022 / Αναθ. 07

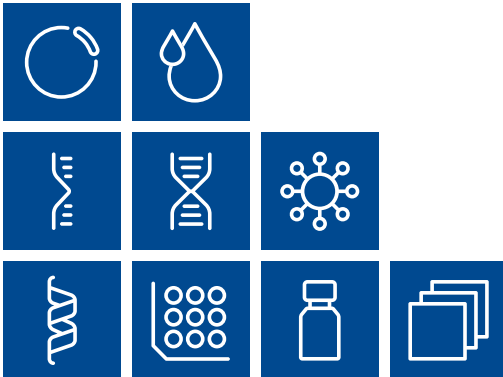
Λόγος αναθεώρησης:

Προσθήκη αναλυτικών και κλινικών δεδομένων απόδοσης στο κεφάλαιο 2.5. Αναφορά σε νέες γλώσσες του χειριδίου χρήσης (κεφάλαιο 1.3).

Εμπορικά σήματα:

To LightCycler είναι εμπορικό σήμα της Roche Group
Η NucleoSpin είναι εμπορικό σήμα της MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG

Όλα τα χρησιμοποιούμενα ονόματα και ενδείξεις μπορεί να είναι εμπορικές επωνυμίες, εμπορικά σήματα ή καταχωρημένες ετικέτες του αντίστοιχου κατόχου τους – ακόμη κι εάν δεν είναι ειδικές ενδείξεις. Η αναφορά προϊόντων και εμπορικών επωνυμιών αποτελεί απλώς ένα είδος πληροφοριών (δηλαδή, δεν προσβάλλει εμπορικά σήματα και εμπορικές επωνυμίες και δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ένα είδος σύστασης ή αξιολόγησης). Όσον αφορά αυτά τα προϊόντα ή τις υπηρεσίες, δεν μπορούμε να παράσχουμε καμία εγγύηση σχετικά με την επιλογή, την αποτελεσματικότητα ή τη λειτουργία.



www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL



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

DE	Tel.: +49 24 21 969-0	info@mn-net.com
CH	Tel.: +41 62 388 55 00	sales-ch@mn-net.com
FR	Tel.: +33 388 68 22 68	sales-fr@mn-net.com
US	Tel.: +1 888 321 62 24	sales-us@mn-net.com

A039590/042x