

Dicembre 2017

Scheda del protocollo QIASymphony[®] SP

Protocollo Complex800_V6_DSP

Questo documento è la *scheda del protocollo QIASymphony SP Complex800_V6_DSP*, revisione 2, per QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, versione 1.

Informazioni generali

Il QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit è studiato per l'uso diagnostico in vitro.

Kit	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit
Materiale campione	Campioni delle vie aeree e della zona urogenitale
Nome del protocollo	Complex800_V6_DSP
Set di controllo del test predefinito	ACS_Complex800_V6_DSP_default_IC
Parte modificabile	Volume di eluito: 60 µl, 85 µl, 110 µl
Versione del software necessaria	Versione 4.0 o superiore

Cassetto "Sample" (Campione)

Tipo di campione	Campioni delle vie aeree (BAL, tamponi asciutti, mezzi di trasporto, aspirati, espettorato) e campioni della zona urogenitale (urina, mezzi di trasporto)
Volume del campione	Dipende dal tipo di provetta per campioni utilizzata; per maggiori informazioni consultare www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Provette per campioni primarie	Per maggiori informazioni consultare www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Provette per campioni secondarie	Per maggiori informazioni consultare www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Inseriti	Dipende dal tipo di provetta per campioni utilizzata; per maggiori informazioni consultare www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Altro	È necessaria una miscela di carrier RNA-tampone AVE; l'utilizzo del controllo interno è opzionale

Cassetto "Reagents and Consumables" (Reagenti e materiali di consumo)

Posizione A1 e/o A2	Cartuccia reagenti (Reagent cartridge, RC)
Posizione B1	Tampone ATL (ATL)
Supporto per rack per puntali 1-17	Puntali con filtro monouso, 200 µl
Supporto per rack per puntali 1-17	Puntali con filtro monouso, 1500 µl
Supporto per box unitari 1-4	Box unitari contenenti le cartucce per la preparazione dei campioni
Supporto per box unitari 1-4	Box unitari contenenti i coperchi per 8 barre

Cassetto "Waste" (Materiali di scarto)

Supporto per box unitari 1-4	Box unitari vuoti
Supporto per sacchetto dei materiali di scarto	Sacchetto dei materiali di scarto
Supporto per contenitore dei residui liquidi	Contenitore dei residui liquidi

Cassetto "Eluate" (Eluito)

Rack per eluizione (si consiglia di utilizzare l'apertura 1, posizione di raffreddamento)	Per maggiori informazioni consultare www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
---	---

Plastica da laboratorio occorrente

	Un lotto, 24 campioni*	Due lotti, 48 campioni*	Tre lotti, 72 campioni*	Quattro lotti, 96 campioni*
Puntali con filtro monouso, 200 µl ^{††}	34	60	86	112
Puntali con filtro monouso, 1500 µl ^{††}	123	205	295	385
Cartucce per la preparazione dei campioni [§]	18	36	54	72
Coperchi per 8 barre [¶]	3	6	9	12

* L'impiego di più di un controllo interno per lotto e l'esecuzione di più di una scansione di inventario richiedono ulteriori puntali con filtro monouso. L'impiego di meno di 24 campioni per lotto riduce il numero di puntali con filtro monouso necessari per ogni processazione.

[†] Ci sono 32 puntali con filtro su ogni rack per puntali.

^{††} La quantità di puntali con filtro necessari include i puntali con filtro per 1 scansione di inventario per ogni cartuccia reagenti.

[§] Ci sono 28 cartucce per la preparazione dei campioni in ogni box unitario.

[¶] Ci sono dodici coperchi per 8 barre in ogni box unitario.

Nota: Le quantità indicate per i puntali con filtro possono variare da quelle visualizzate sul touch screen a seconda delle impostazioni, ad esempio, il numero di controlli interni utilizzati per ogni lotto.

Volume di eluizione selezionato

Volume di eluizione selezionato (µl)*	Volume di eluizione iniziale (µl) [†]
60	90
85	115
110	140

* Volume di eluizione selezionato sul touch screen. Si tratta del volume accessibile minimo di eluito nella provetta di eluizione finale.

[†] Il volume iniziale della soluzione di eluizione necessaria per garantire il volume effettivo di eluito è identico al volume selezionato.

Preparazione della miscela di controllo interno-carrier RNA (CARRIER)-tampone AVE (AVE)

Volume di eluizione selezionato (µl)	Volume soluzione madre con carrier RNA (CARRIER) (µl)	Volume controllo interno (µl)*	Volume tampone AVE (AVE) (µl)	Volume finale per campione (µl)
60	3	9	108	120
85	3	11,5	105,5	120
110	3	14	103	120

* Il calcolo della quantità di controllo interno si basa sui volumi di eluizione iniziali. L'ulteriore volume vuoto dipende dal tipo di provetta per campioni utilizzata; per maggiori informazioni consultare www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Nota: i valori indicati in tabella si riferiscono alla preparazione della miscela di controllo interno-carrier RNA (CARRIER) per un test a valle che richiede 0,1 µl di controllo interno/µl di eluito.

Le provette contenenti la miscela di controllo interno-carrier RNA (CARRIER)-tampone AVE (AVE) vengono collocate in un portaprovette. Il portaprovette contenente la/e miscela/e di controllo interno-carrier RNA (CARRIER)-tampone AVE (AVE) deve essere collocato nell'apertura A del cassetto campioni.

A seconda del numero di campioni da elaborare, raccomandiamo l'impiego di provette da 2 ml (Sarstedt, cat. n. 72.693 o 72.694) o provette da 14 ml 17 x 100 mm in polistirolo a fondo tondo (Becton Dickinson, cat. n. 352051) per diluire il controllo interno, come descritto nella tabella sottostante. Il volume può essere suddiviso in 2 o più provette.

Calcolo del volume della miscela di controllo interno

Tipo di provetta	Nome sul touch screen QIASymphony	Calcolo del volume per provetta della miscela di controllo interno-carrier RNA (CARRIER)-tampone AVE (AVE)
Microprovetta 2 ml con tappo; microprovetta 2 ml, PP, FLANGIATA, (Sarstedt, cat. n. 72.694)	SAR#72.694 T2.0 ScrewSkirt	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l}^*$
Microprovetta da 2 ml con tappo; microprovetta da 2 ml, PP, NON FLANGIATA, (Sarstedt, cat. n. 72.693)	SAR#72.693 T2.0 Screw	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l}^*$
Provetta da 14 ml, 17 x 100 mm, in polistirene a fondo tondo (Becton Dickinson, cat. n. 352051)	BD#352051 FalconPP 17x100	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 600 \mu\text{l}^\dagger$

* Utilizzare questa equazione per calcolare il volume richiesto della miscela di controllo interno (n = numero di campioni; 120 µl = volume di miscela controllo interno-carrier RNA (CARRIER)-Tampone AVE (AVE); 360 µl = volume vuoto richiesto per provetta). Per esempio per 12 campioni (n = 12): $(12 \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l} = 1800 \mu\text{l}$. Non riempire la provetta con più di 1,9 ml (ossia un massimo di 12 campioni per provetta). Per processare più di 12 campioni, usare provette supplementari, assicurandosi di aggiungere il volume vuoto per ogni provetta.

† Utilizzare questa equazione per calcolare il volume richiesto della miscela di controllo interno-carrier RNA (CARRIER)-Tampone AVE (AVE) (n = numero di campioni; 120 µl = volume di miscela di controllo interno-carrier RNA (CARRIER)-Tampone AVE (AVE); 600 µl = volume vuoto richiesto per provetta). Per esempio per 96 campioni (n = 96): $(96 \times 120 \mu\text{l}) + 600 \mu\text{l} = 12120 \mu\text{l}$.

Per gli inserti necessari, consultare www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Uso di materiale da laboratorio FIX

L'uso del rilevamento del livello del liquido (liquid-level detection, LLD) per il trasferimento dei campioni permette di utilizzare provette primarie e secondarie. Tuttavia questa operazione richiede un certo volume morto nelle rispettive provette. Per ridurre al minimo i volumi morti, è preferibile non usare il rilevamento del livello del liquido nelle provette secondarie. È disponibile materiale da laboratorio FIX specifico (per es. SAR_FIX_#72.694 T2.0 ScrewSkirt) che è possibile anche selezionare sul touchscreen del QIASymphony SP. Questo tipo di provetta/rack impone alcuni limiti all'aspirazione. Il campione viene aspirato ad un'altezza particolare nella provetta, altezza definita dal volume di campione da trasferire. Pertanto è essenziale verificare che venga utilizzato il volume che figura nella lista del materiale da laboratorio. Sono disponibili liste di materiale da laboratorio da scaricare da www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Le provette campione da poter usare con o senza rilevamento del livello del liquido e i volumi di campione richiesti sono elencati in www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Non utilizzare volumi superiori o inferiori al volume richiesto poiché questo potrebbe determinare errori durante la preparazione dei campioni.

Le provette per il rilevamento del livello del liquido e le provette non previste per il rilevamento del livello del liquido possono essere trattate in un solo lotto/processo.

Preparazione dei campioni

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza (material safety data sheets, MSDS), reperibili presso il fornitore.

Urina

L'urina può essere processata senza ulteriori pretrattamenti. Trasferire il campione in una provetta Sarstedt da 2 ml (cat. n. 72.693 o 72.694) e posizionare il campione nel portaprovette. In alternativa è possibile utilizzare provette primarie. Il volume iniziale minimo necessario può variare a seconda della provetta primaria utilizzata. Su www.qiagen.com/goto/dsphandbooks sono disponibili gli elenchi dei formati di provetta primaria e secondaria compatibili, compreso il volume iniziale minimo necessario per ogni protocollo. Il sistema è ottimizzato per campioni di pura urina che non contengono conservanti. Per aumentare la sensibilità per i patogeni batterici è possibile centrifugare i campioni. Dopo aver eliminato il supernatante, è possibile risospingere il pellet in

un tampone ATL (ATL) di almeno 800 µl (cat. n. 939016). Trasferire il campione in una provetta Sarstedt da 2 ml (cat. n. 72.693 o 72.694). Collocare il campione nel portaprovette e sottoporlo a processo utilizzando il protocollo Complex800_V6_DSP e il materiale FIX occorrente.

Isolamento del DNA genomico da batteri Gram-positivi

È possibile migliorare la purificazione del DNA per alcuni batteri Gram-positivi tramite pretrattamento enzimatico prima di trasferire il campione nel QIAAsymphony SP e di cominciare il protocollo Complex800_V6_DSP.

1. Sedimentare i batteri centrifugando a 5000 x g per 10 minuti.
2. Sospendere il pellet di batteri in 900 µl della soluzione enzimatica adeguata (20 mg/ml di lisozima o 200 µg/ml di lisostafina; 20 mM Tris-HCl, pH 8; 2 mM EDTA; 1,2% Triton X-100).
3. Incubare a 37 °C per almeno 30 minuti (± 2 minuti).
4. Centrifugare brevemente la provetta per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.
5. Trasferire il campione in una provetta Sarstedt da 2 ml (cat. n. 72.693 o 72.694), collocare il campione nel portaprovette e procedere con il protocollo Complex800_V6_DSP e il materiale FIX occorrente.

Campioni viscosi o mucosi

Alcuni campioni (come espettorato, aspirati dalle vie aeree) possono essere viscosi e richiedere la liquefazione per consentire la pipettatura. I campioni a bassa viscosità non richiedono ulteriori preparazioni. I campioni a viscosità medio-alta devono essere preparati come segue:

1. diluire il campione 1:1 con Sputasol*† (Oxoid, cat. n. SR0233) o 0,3% (p/v) DTT.
Nota: la soluzione 0,3% (p/v) DTT può essere realizzata anticipatamente e conservata in aliquote a -20 °C. Eliminare le aliquote scongelate dopo l'uso.
2. Incubare a 37 °C finché la viscosità del campione non è adatta per la pipettatura.
3. Trasferire almeno 900 µl del campione in una provetta Sarstedt da 2 ml (cat. n. 72.693 o 72.694). Processare il campione usando il protocollo Complex800_V6_DSP.

* Sputasol (Oxoid, cat. n. SR0233, www.oxoid.com) o ditiotreitolo (DTT).

† Elenco di fornitori incompleto.

Tamponi asciutti di liquidi corporei e secrezioni

1. Immergere l'estremità del tampone asciutto in 1150 µl di tampone ATL (ATL) (cat. n. 939016) e incubare a 56 °C per 15 minuti (± 1 minuto), miscelando in continuazione. Se la miscelazione non è possibile, agitare su vortex prima e dopo l'incubazione per almeno 10 secondi.
2. Rimuovere il tampone e spremere tutto il liquido premendo il tampone contro la parte interna della provetta.
3. Trasferire almeno 900 µl del campione in una provetta Sarstedt da 2 ml (cat. n. 72.693 o 72.694). Processare il campione con il protocollo Complex800_V6_DSP.

Nota: Questo protocollo è ottimizzato per tamponi di cotone o polietilene. Quando si usano altri tamponi, potrebbe essere necessario adeguare il volume del tampone ATL (ATL) per garantire la disponibilità di almeno 900 µl di materiale campione.

Tamponi delle vie aeree o della zona urogenitale conservati in mezzi di trasporto

È possibile usare mezzi di conservazione per tamponi delle vie aeree o della zona urogenitale senza pretrattamento. Se il tampone non è stato rimosso, premerlo contro l'interno della provetta per spremere il liquido. Eventuali eccessi di muco nel campione devono essere rimossi in questo momento, raccogliendoli sul tampone. Ogni residuo di liquido nel muco e nel tampone deve essere poi spremuto premendo il tampone contro l'interno della provetta. Infine occorre rimuovere ed eliminare il tampone e il muco. Se i campioni sono viscosi, eseguire un passaggio di liquefazione (vedere sopra "Campioni viscosi o mucosi") prima di trasferire il campione nel QIASymphony SP. In mancanza di una quantità sufficiente di materiale iniziale, pipettare il tampone ATL (ATL) nel mezzo di trasporto per ottenere il volume iniziale minimo necessario, quindi agitare su vortex il campione per 15-30 secondi nella provetta (se il mezzo di trasporto contiene il tampone, eseguire questo passaggio prima di rimuovere il tampone). Trasferire il campione in una provetta Sarstedt da 2 ml (cat. n. 72.693 o 72.694) e posizionare il campione nel portaprovette. In alternativa è possibile utilizzare provette primarie. Il volume iniziale minimo necessario può variare a seconda della provetta primaria utilizzata. Su www.qiagen.com/goto/dsphandbooks sono disponibili gli elenchi delle provette primarie e secondarie compatibili, compreso il volume iniziale minimo necessario per ogni protocollo.

Cronologia delle revisioni

Documento cronologia delle revisioni	
R2 12/2017	Aggiornamento per la versione 5.0 del software QIASymphony

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN®. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza QIAGEN o al distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (Gruppo QIAGEN). I marchi registrati, i marchi di fabbrica ecc. utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.
12/2017 HB-0301-S30-002 © 2017 QIAGEN. Tutti i diritti riservati.

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