

Dicembre 2017

Scheda del protocollo QIASymphony[®] SP

Protocollo Complex800_OBL_V4_DSP

Questo documento è la *scheda del protocollo* QIASymphony SP Complex800_OBL_V4_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_OBL_V4_DSP |
| Set di controllo del test predefinito | ACS_Complex800_OBL_V4_DSP |
| Parte modificabile | Volume di eluizione: 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 | non pertinente |
| Supporto per rack per puntali 1-17 | Puntali con filtro monouso, 200 µl |
| Supporto per rack per puntali 1-17 | Puntali con filtro monouso, 1.500 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 |

n/a = non applicabile.

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† | 96 | 96 | 128 | 128 |
| Puntali con filtro monouso, 1500 µl† | 128 | 192 | 224 | 288 |
| Cartucce per la preparazione dei campioni§ | 18 | 36 | 54 | 72 |
| Coperchi per 8 barre¶ | 3 | 6 | 9 | 12 |

* L'esecuzione di più scansioni di inventario richiede puntali con filtro monouso supplementari. L'impiego di meno di 24 campioni per lotto riduce il numero di puntali 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.

Lisi off-board

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.

I protocolli QIASymphony Complex sono composti da 4 passaggi: lisi, legame, lavaggio, eluizione. Per alcuni campioni è utile eseguire la lisi manualmente, ad esempio per l'inattivazione dei patogeni in un armadio di biosicurezza. Il protocollo Complex800_OBL_V4_DSP consente di eseguire la lisi manuale in modo simile al protocollo Complex800_V6_DSP. Trasferire i campioni pretrattati nel QIASymphony SP ed elaborarli con protocollo Complex800_OBL_V4_DSP.

Nota: Il protocollo Complex800_OBL_V4_DSP richiede tampone ACL e tampone ATL (ATL). Il tampone ACL (cat. n. 939017) e il tampone ATL (ATL) (cat. n. 939016) non fanno parte del QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit e devono essere ordinati separatamente.

Lisi manuale

1. Pipettare 80 µl di proteinasi K, 295 µl di tampone ATL (ATL), 120 µl di miscela carrier RNA-controllo interno e 560 µl di tampone ACL in una provetta da 4,5 ml (Nunc CryoTube 12,5 x 92 mm, provetta in polipropilene da 4,5 ml, Nunc cat. n. 363452).

Nota: Quando ci si accinge a processare più di un campione con la lisi manuale, è possibile preparare una soluzione concentrata di questa soluzione. Basta moltiplicare i volumi necessari per un campione per il numero totale di campioni da processare e includere il volume supplementare all'equivalente di 2 campioni extra. Capovolgere la provetta varie volte per miscelare, trasferire 1055 µl in una provetta da 4,5 ml per ogni campione e poi andare avanti per ogni campione con il passaggio 4.

2. Chiudere il coperchio e miscelare la provetta capovolgendola 5 volte.
3. Centrifugare brevemente la provetta per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.
4. Aggiungere 800 µl di campione alla provetta, chiudere il coperchio e miscelare con vortex per 10 secondi.
5. Incubare la provetta a 68 °C per 15 minuti (± 1 minuto).
6. Centrifugare brevemente la provetta per rimuovere le gocce dall'interno del coperchio. Posizionare gli inserti per le provette dei campioni adatte in un portaprovette e caricare le provette dei campioni (senza coperchio).

Preparazione dei campioni

Urina

L'urina può essere processata senza ulteriori pretrattamenti. 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 risospendere il pellet in un tampone ATL (ATL) di almeno 800 µl (cat. n. 939016). Usare 800 µl del materiale pretrattato come campione per la preparazione della lisi off-board.

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 QIA Symphony SP e di cominciare il protocollo Complex800_OBL_V4_DSP.

1. Sedimentare i batteri centrifugando a 5000 x g per 10 minuti.

2. Sospendere il pellet di batteri in 800 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. Usare 800 µl del materiale pretrattato come campione per la preparazione della lisi off-board.

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% DTT può essere realizzata anticipatamente e conservata in aliquote adeguate a -20 °C. Un'aliquota scongelata deve essere eliminata dopo l'uso.
2. Incubare a 37 °C finché la viscosità del campione non è adatta per la pipettatura.
3. Usare 800 µl del materiale pretrattato come campione per la preparazione della lisi off-board.

Tamponi asciutti di liquidi corporei e secrezioni

1. Immergere l'estremità del tampone asciutto in 1050 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. Usare 800 µl del materiale pretrattato come campione per la preparazione della lisi off-board.

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 800 µl di materiale campione.

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

† Elenco di fornitori incompleto.

Tamponi delle vie aeree o della zona urogenitale

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). Usare 800 µl del materiale come campione per la preparazione della lisi off-board.

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-S31-002 © 2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

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