

December 2017

Protocolblad QIASymphony[®] SP

Protocol Complex800_OBL_V4_DSP

Dit document is het *QIASymphony SP-protocolblad*, R2, voor Complex800_OBL_V4_DSP voor QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, versie 1.

Algemene informatie

De QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit is bedoeld voor gebruik in de in-vitrodiagnostiek.

Kit	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit
Monstermateriaal	Ademhalings- en urogenitale monsters
Naam protocol	Complex800_OBL_V4_DSP
Standaard assaycontroleset	ACS_Complex800_OBL_V4_DSP
Bewerkbaar	Elutievolume: 60 µl, 85 µl, 110 µl
Vereiste softwareversie	Versie 4.0 of hoger

De lade 'Sample' (Monsterlade)

Monstertype	Ademhalingsmonsters (BAL, gedroogde uitstrijkjes, transportmedia, aspiraten, sputum) en urogenitale monsters (urine, transportmedia)
Monstervolume	Afhankelijk van het gebruikte type monsterbuis, raadpleeg www.qiagen.com/goto/dsphandbooks voor meer informatie
Primaire monsterbuizen	Raadpleeg www.qiagen.com/goto/dsphandbooks voor meer informatie.
Secondaire monsterbuizen	Raadpleeg www.qiagen.com/goto/dsphandbooks voor meer informatie.
Inzetten	Afhankelijk van het gebruikte type monsterbuis, raadpleeg www.qiagen.com/goto/dsphandbooks voor meer informatie
Overige	AVE-buffermengsel van carrier-RNA vereist; gebruik van interne controle is optioneel

De lade 'Reagents and Consumables' (Reagentia- en verbruiksartikelenlade)

Positie A1 en/of A2	Reagenscartridge (Reagent cartridge, RC)
Positie B1	n.v.t.
Tiprekhouder 1-17	Wegwerpbaar filtertips, 200 µl
Tiprekhouder 1-17	Wegwerpbaar filtertips, 1500 µl
Verpakkingsdooshouder 1-4	Verpakkingsdozen met monsterbereidingscartridges
Verpakkingsdooshouder 1-4	Verpakkingsdozen met 8-staafhulzen

n.v.t. = niet van toepassing.

De lade 'Waste' (Afvallade)

Verpakkingsdooshouder 1-4	Lege verpakkingsdozen
Afvalzakhouder	Afvalzak
Houder afvalvloeistoffenfles	Afvalvloeistoffenfles

De lade 'Eluate' (Eluaatlade)

Elutierek (het wordt aangeraden om slot 1, de koelpositie, te gebruiken)	Raadpleeg www.qiagen.com/goto/dsphandbooks voor meer informatie
--	---

Benodigde plastic artikelen

	Eén batch, 24 monsters*	Twee batches, 48 monsters*	Drie batches, 72 monsters*	Vier batches, 96 monsters*
Wegwerpbare filtertips, 200 µl [†]	96	96	128	128
Wegwerpbare filtertips, 1500 µl [†]	128	192	224	288
Monsterbereidingscartridges [§]	18	36	54	72
8-staafhulzen [¶]	3	6	9	12

* Voor het uitvoeren van meerdere voorraadscans zijn extra wegwerpbare filtertips nodig. Bij gebruik van minder dan 24 monsters per batch zijn minder wegwerpbare filtertips per run nodig.

[†] Er zitten 32 filtertips in een filtertiprek.

[‡] Het aantal benodigde filtertips is inclusief tips voor 1 voorraadscan per reagenscartridge.

[§] Er zitten 28 monsterbereidingscartridges in een verpakkingsdoos.

[¶] Er zitten twaalf 8-staafhulzen in een verpakkingsdoos.

Opmerking: De gegeven aantallen filtertips kunnen afwijken van de aantallen die op het aanraakscherm worden weergegeven. Dit is afhankelijk van de instellingen, bijvoorbeeld het aantal gebruikte interne controles per batch.

Geselecteerd elutievolume

Geselecteerd elutievolume (µl)*	Aanvankelijk elutievolume (µl) [†]
60	90
85	115
110	140

* Het elutievolume dat op het aanraakscherm is geselecteerd. Dit is het minimaal toegankelijke eluaatvolume in de laatste elutiebus.

[†] Het aanvankelijke volume van de elutieoplossing is nodig om er zeker van te zijn dat het daadwerkelijke eluaatvolume gelijk is aan het geselecteerde volume.

Bereiding van het AVE-buffermengsel van carrier-RNA (CARRIER) voor interne controle

Geselecteerd elutievolume (µl)	Stockvolume carrier-RNA (CARRIER) (µl)	Volume interne controle (µl)*	Volume AVE-buffer (AVE) (µl)	Uiteindelijk volume per monster (µl)
60	3	9	108	120
85	3	11,5	105,5	120
110	3	14	103	120

* De berekening van de hoeveelheid interne controle is gebaseerd op de aanvankelijke elutievolumes. Extra dood volume is afhankelijk van het gebruikte type monsterbuisje. Raadpleeg www.qiagen.com/goto/dsphandbooks voor meer informatie.

Opmerking: De waarden die in de tabel worden weergegeven, zijn voor het voorbereiden van het AVE-buffermengsel van carrier-RNA (CARRIER) voor interne controle voor een vervolgcassay waarvoor 0,1 µl interne controle/µl eluaat benodigd is.

Off-board lysering

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

De QIASymphony complexe protocollen bestaan uit 4 stappen: lyseren, binden, wassen, elueren. Voor monsters is het handig om de lysering handmatig uit te voeren, bijvoorbeeld voor de inactivatie van pathogenen in een bioveiligheidskast. Het Complex800_OBL_V4_DSP-protocol maakt het uitvoeren van handmatige lysering op een vergelijkbare manier als met het Complex800_V6_DSP-protocol mogelijk. Voorbehandelde monsters worden overgebracht naar de QIASymphony SP en verwerkt met het Complex800_OBL_V4_DSP-protocol.

Opmerking: Het Complex800_OBL_V4_DSP-protocol vereist buffer-ACL en buffer-ATL (ATL). Buffer-ACL (cat.nr. 939017) en buffer-ATL (ATL) (cat.nr. 939016) maken geen deel uit van de QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit en moeten afzonderlijk worden besteld.

Handmatige lysering

1. Pipetteer 80 µl proteïnase K, 295 µl buffer-ATL (ATL), 120 µl carrier-RNA-mengsel voor interne controle en 560 µl buffer-ACL in een 4,5 ml buis (Nunc Cryobuis 12,5 x 92 mm, 4,5 ml polypropyleen buis, Nunc cat.nr. 363452).

Opmerking: Er kan een stockoplossing van deze oplossing worden gemaakt als er meer dan één monster moet worden verwerkt door middel van handmatige lysering. Vermenigvuldig het volume dat nodig is voor één monster met het totale aantal monsters dat moet worden

verwerkt en tel daar het aanvullend volume dat overeenkomt met 2 extra monsters bij op. Draai de buis enkele keren om om te mengen, breng voor ieder monster 1055 µl over naar een 4,5 ml Sarstedt-buis en ga vervolgens voor ieder monster verder met stap 4.

2. Sluit het deksel en meng door de buis 5 keer om te draaien.
3. Centrifugeer de buis kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de dop te verwijderen.
4. Voeg 800 µl monster toe aan de buis, sluit het deksel en meng gedurende 10 seconden met een pulse-vortexmixer.
5. Incubeer bij 68 °C gedurende 15 minuten (± 1 minuut).
6. Centrifugeer de buis kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de dop te verwijderen. Plaats de inzetten voor de juiste monsterbuizen in een buizendrager en laad de monsterbuizen (zonder doppen).

Bereiding van monstermateriaal

Urine

Urine kan worden verwerkt zonder verdere voorbehandeling. Het systeem is geoptimaliseerd voor pure urinemonsters die geen conserveermiddelen bevatten. Monsters kunnen worden gecentrifugeerd om de gevoeligheid voor bacteriële pathogenen te verhogen. De pellet kan opnieuw worden gesuspenseerd in minstens 800 µl buffer-ATL (ATL) (cat.nr. 939016) nadat de supernatant is verwijderd. Gebruik 800 µl van het voorbehandelde materiaal als monster ter voorbereiding van de off-board lysering.

Isolatie van genomisch DNA uit grampositieve bacteriën

DNA-purificatie kan voor sommige grampositieve bacteriën worden verbeterd door enzymatische voorbehandeling alvorens het monster over te brengen naar de QIASymphony SP en het Complex800_OBL_V4_DSP-protocol te starten.

1. Pelletiseer de bacteriën door 10 minuten te centrifugeren bij 5000 x g.
2. Suspendeer de bacteriële pellet in 800 µl van de geschikte enzymenoplossing (20 mg/ml lysozym of 200 µg/ml lysostafine in 20 mM tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1,2% Triton X-100).
3. Incubeer bij 37 °C gedurende 30 minuten (± 2 minuten).
4. Centrifugeer het buisje kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de dop te verwijderen.

5. Gebruik 800 µl van het voorbehandelde materiaal als monster ter voorbereiding van de off-board lysering.

Viskeuze of slijmerige monsters

Sommige monsters (bijv. sputum, ademhalingsaspiraten) kunnen viskeus zijn en moeten mogelijk vloeibaar worden gemaakt om deze te kunnen pipetteren. Monsters met geringe viscositeit vereisen geen aanvullende voorbereiding. Monsters met gemiddelde of hoge viscositeit moeten op de volgende manier worden voorbereid:

1. vermeng het monster in de verhouding 1:1 met Sputasol*† (Oxoid, cat.nr. SR0233) of 0,3% (w/v) DTT.
Opmerking: De oplossing met 0,3% (w/v) DTT kan eerder worden gemaakt en worden opgeslagen in aliquots bij -20 °C. Een ontdooide aliquot moet na gebruik worden weggegooid.
2. Incubeer bij 37 °C totdat de viscositeit van het monster geschikt is voor pipetteren.
3. Gebruik 800 µl van het voorbehandelde materiaal als monster ter voorbereiding van de off-board lysering.

Wattenstaafjes met opgedroogde lichaamsvloeistoffen en -afscheiding

1. Dompel de tip van het gedroogde wattenstaafje onder in 1050 µl buffer-ATL (ATL) (cat.nr. 939016) en incubeer 15 minuten (± 1 minuut) bij 56 °C. Meng voortdurend. Vortex minstens 10 seconden voor en na incubatie indien mengen niet mogelijk is.
2. Verwijder het wattenstaafje en pers er alle vloeistof uit door het wattenstaafje tegen de binnenkant van de buis te drukken.
3. Gebruik 800 µl van het voorbehandelde materiaal als monster ter voorbereiding van de off-board lysering.

Opmerking: Dit protocol is geoptimaliseerd voor wattenstaafjes van katoen of polyetheen. Het kan nodig zijn het volume buffer-ATL (ATL) aan te passen indien er andere wattenstaafjes worden gebruikt, om ervoor te zorgen dat er minstens 800 µl beschikbaar is als monstermateriaal.

* Sputasol (Oxoid, cat.nr. SR0233, www.oxoid.com) of dithiothreitol (DTT).

† Dit is geen volledige lijst van leveranciers.

Ademhalings- of urogenitale wattenstaafjes

Opslagmedia voor ademhalings- of urogenitale wattenstaafjes kunnen zonder voorbehandeling worden gebruikt. Druk het wattenstaafje tegen de zijkant van de buis om de vloeistof eruit te persen indien het wattenstaafje nog niet is verwijderd. Overtollig slijm in het specimen moet nu worden verwijderd door dit op het wattenstaafje te verzamelen. Overgebleven vloeistof uit het slijm en het wattenstaafje moet vervolgens worden verwijderd door het wattenstaafje tegen de binnenkant van de buis te drukken. Als laatste stap moeten het wattenstaafje en het slijm worden verwijderd en weggegooid. Maak het monster vloeibaar (zie 'Viskeuze of slijmerige monsters' hierboven) indien de monsters viskeus zijn alvorens deze over te brengen naar de QIASymphony SP. Pipetteer indien er niet genoeg startmateriaal beschikbaar is buffer-ATL (ATL) in het transportmedium om het vereiste minimale startvolume aan te passen en vortex het monster 15–30 seconden in de buis (voer deze stap uit voordat het wattenstaafje wordt verwijderd indien het transportmedium het wattenstaafje bevat). Gebruik 800 µl van het materiaal als monster ter voorbereiding van de off-board lysering.

Revisiegeschiedenis

Revisiegeschiedenis document	
R2 12/2017	Wijziging voor QIASymphony-software versie 5.0

Zie voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules de handleiding of gebruikershandleiding van de desbetreffende QIAGEN® Kit. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN Kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische dienst van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group). Gedeponeerde namen, handelsmerken, etc. die in dit document worden gebruikt, ook al zijn deze niet specifiek als zodanig aangeduid, mogen niet worden beschouwd als niet wettelijk beschermd. 12/2017 HB-0301-S31-002 © 2017 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

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