

Prosinec 2017

List protokolu QIAasymphony[®] SP

Protokol Complex200_OBL_V4_DSP

Tento dokument představuje list protokolu Complex200_OBL_V4_DSP *QIAasymphony SP*, R2, pro sadu QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit, verze 1.

Všeobecné informace

Sada QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit je určena pro diagnostické účely in vitro.

Sada	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit
Materiál vzorku	Respirační a urogenitální vzorky
Název protokolu	Complex200_OBL_V4_DSP
Výchozí kontrolní sada	ACS_Complex200_OBL_V4_DSP
Editovatelné	Objem eluátu: 60 µl, 85 µl, 110 µl
Vyžadovaná verze softwaru	Verze 4.0 nebo vyšší

Zásuvka „Sample“ (Vzorek)

Typ vzorku	Respirační vzorky (BAL, sušené stěry, přepravní média, aspiráty, sputum) a urogenitální vzorky (moč, přepravní média)
Objem vzorku	Závisí na typu použitých zkumavek na vzorky; další informace získáte na www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Zkumavky primárního vzorku	Další informace viz www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Zkumavky sekundárního vzorku	Další informace viz www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Vložky	Závisí na typu použitých zkumavek na vzorky; další informace získáte na www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Jiné	Nutná je směs nosičové RNA a pufru AVE; použití interní kontroly je volitelné

Zásuvka „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotřební díly)

Poloha A1 a/nebo A2	Zásobník s reagenty (Reagent cartridge, RC)
Poloha B1	–
Držák se stojánkem pro špičky 1–17	Filtrační špičky k jednorázovému použití, 200 µl
Držák se stojánkem pro špičky 1–17	Filtrační špičky k jednorázovému použití, 1500 µl
Držák jednotkové krabice 1–4	Jednotkové krabice obsahující zásobníky na přípravu vzorků
Držák jednotkové krabice 1–4	Jednotkové krabice obsahující 8hrotové kryty

– = neuvedeno.

Zásuvka „Waste“ (Odpad)

Držák jednotkové krabice 1–4	Prázdňé jednotkové krabice
Držák odpadních sáčků	Odpadní sáček
Držák nádoby na tekutý odpad	Nádoba na tekutý odpad

Zásuvka „Eluate“ (Eluát)

Eluční stojánek (doporučujeme použít chladicí pozici, slot 1)

Další informace viz www.qiagen.com/goto/dsphandbooks

Požadované plastové vybavení

	Jedna šarže, 24 vzorků*	Dvě šarže, 48 vzorků*	Tři šarže, 72 vzorků*	Čtyři šarže, 96 vzorků*
Filtrační špičky k jednorázovému použití, 200 µl†‡	96	96	128	128
Filtrační špičky k jednorázovému použití, 1500 µl†‡	128	192	224	288
Zásobníky pro přípravu vzorků§	18	36	54	72
8hrotové kryty¶	3	6	9	12

* Provedení více než jednoho inventárního skenu vyžaduje přídatné filtrační špičky k jednorázovému použití. Použití méně než 24 vzorků na šarži snižuje počet špiček k jednorázovému použití požadovaných na jeden cyklus.

† Jeden stojánek na špičky obsahuje 32 špiček s filtrem.

‡ Počet požadovaných filtračních špiček zahrnuje filtrační špičky pro 1 inventární sken na kazetu s reagensy.

§ V jednotkové krabici je 28 kazet s preparáty vzorku.

¶ V jednotkové krabici je dvanáct 8hrotových krytů.

Poznámka: Udávaný počet filtračních špiček se liší od počtu zobrazenému na dotykové obrazovce v závislosti na nastaveních, např. počet interních kontrol použitých na dávku.

Zvolený eluční objem

Zvolený eluční objem (µl)*	Původní eluční objem (µl)†
60	90
85	115
110	140

* Eluční objem se vybírá na dotykové obrazovce. Toto je minimální dosažitelné množství eluátu ve výsledné eluční zkumavce.

† Původní objem elučního roztoku je vyžadován, aby bylo zajištěno, že skutečný objem eluátu odpovídá zvolenému objemu.

Příprava směsi interní kontroly – nosičové RNA (CARRIER) – pufru AVE (AVE)

Zvolený eluční objem (μl)	Objem základní nosičové RNA (CARRIER) (μl)	Objem interní kontroly (μl)*	Objem pufru AVE (AVE) (μl)	Konečný objem na vzorek (μl)
60	3	9	108	120
85	3	11,5	105,5	120
110	3	14	103	120

* Výpočet množství interní kontroly se zakládá na výchozích elučních objemech. Dodatečný mrtvý objem závisí na typu použité zkumavky na vzorek; další informace viz www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Poznámka: Hodnoty uvedené v tabulce jsou pro přípravu směsi interní kontroly – nosičové RNA (CARRIER) pro navazující test, který vyžaduje 0,1 μl interní kontroly/μl eluátu.

Lýza mimo přístroj

Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v bezpečnostních listech (material safety data sheets, MSDS) příslušných materiálů, které obdržíte od dodavatele výrobku.

Protokoly QIASymphony Complex zahrnují 4 kroky: lýzu, vázání, promývání a eluci. U některých vzorků je vhodné provádět lýzu manuálně, např. pro inaktivaci patogenů v biologicky bezpečné skříni. Protokol Complex200_OBL_V4_DSP umožňuje podobné provedení manuální lýzy jako protokol Complex200_V6_DSP. Předem upravené vzorky se přenesou do přístroje QIASymphony SP a zpracují se podle protokolu Complex200_OBL_V4_DSP.

Poznámka: Protokol Complex200_OBL_V4 vyžaduje pufr ACL a pufr ATL (ATL). Pufr ACL (kat. č. 939017) a pufr ATL (ATL) (kat. č. 939016) nejsou součástí sady QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit a je nutno je objednat samostatně.

Manuální lýza

1. Do 2 ml zkumavky Sarstedt (kat. č. 72.693 nebo 72.694) napipetujte směs 20 µl proteinázy K, 100 µl pufru ATL (ATL), 120 µl nosičové RNA a interní kontroly a 190 µl pufru ACL.

Poznámka: Pokud se bude pomocí manuální lýzy zpracovávat více než jeden vzorek, lze připravit základní koncentrovaný roztok tohoto roztoku. Jednoduše vynásobte objemy nutné na jeden vzorek celkovým počtem vzorků, které se mají zpracovat, a přidejte dodatečný objem ekvivalentní 2 dalším vzorkům. Zkumavku několikrát převraťte, aby se roztok promíchal, pro každý vzorek přeneste do 2ml zkumavky Sarstedt 430 µl a poté u každého vzorku pokračujte krokem 4.

2. Uzavřete víčko a promíchejte 5x otočením zkumavky.
3. Zkumavku krátce odstředějte, aby se odstranily kapky z vnitřní strany víčka.
4. Do zkumavky přidejte 200 µl vzorku, uzavřete víčko a míchejte 10 sekund na pulzní třepačce.
5. Inkubujte po dobu 15 minut (± 1 minuta) při teplotě 68 °C.
6. Zkumavku krátce odstředějte, aby se odstranily kapky z vnitřní strany víčka.
7. Do nosiče zkumavek umístěte vložky pro příslušné zkumavky na vzorky a naplňte ho zkumavkami na vzorky (bez víček).

Příprava materiálu vzorků

Moč

Moč lze zpracovávat bez další předběžné úpravy. Systém je optimalizován pro čisté vzorky moči, které neobsahují konzervanty. Pro zvýšení citlivosti na bakteriální patogeny se mohou vzorky odstředit v odstředivce. Po odstranění supernatantu lze peletu resuspendovat nejméně v 200 µl pufru ATL (ATL) (kat. č. 939016). Jako vzorek pro přípravu lýzy mimo přístroj použijte 200 µl předem upraveného materiálu.

Izolace genomové DNA z gram-pozitivních bakterií

U některých gram-pozitivních bakterií lze před přenosem vzorku do přístroje QIASymphony SP a zahájením protokolu Complex200_OBL_V4_DSP purifikaci DNA zlepšit enzymatickou předběžnou úpravou.

1. Bakterie oddělte odstředováním při 5000 x g po dobu 10 minut.
2. Bakteriální peletu suspendujte v 200 µl vhodného roztoku enzymu (20 mg/ml lysozymu nebo 200 µg/ml lysostafinu v 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1,2% Triton X-100).

3. Inkubujte při teplotě 37 °C nejméně po dobu 30 minut (± 2 minuty).
4. Krátce odstředujte zkumavku pro odstranění kapek z vnitřní strany víka.
5. Jako vzorek pro přípravu lýzy mimo přístroj použijte 200 μ l předem upraveného materiálu.

Viskózní nebo hlenovité vzorky

Některé vzorky (např. sputum, respirační aspiráty) mohou být viskózní a vyžadovat zkapalnění, aby bylo možné je pipetovat. Vzorky nízké viskozity další přípravu nevyžadují. Vzorky střední a vysoké viskozity musí být připravovány takto:

6. Vzorek rozřeďte v poměru 1:1 se Sputasolem^{*†} (Oxoid, kat. č. SR0233) nebo 0,3% (hm.) DTT.

Poznámka: 0,3% roztok DTT lze připravit předem a skladovat ve vhodných alikvotech při teplotě -20 °C. Roztavené alikvoty se musí po použití zlikvidovat.

7. Inkubujte při teplotě 37 °C, dokud nebude viskozita vhodná pro pipetování.
8. Jako vzorek pro přípravu lýzy mimo přístroj použijte 200 μ l předem upraveného materiálu.

Sušené stěry tělesných tekutin a sekretů

9. Špičku se sušeným stěrem ponořte do 450 μ l pufru ATL (ATL) (kat. č. 939016) a za trvalého míchání inkubujte při teplotě 56 °C po dobu 15 minut (± 1 minuta). Není-li míchání možné, protřepávejte vortexem před a po inkubaci nejméně po dobu 10 sekund.
10. Tampon se stěrem vyjměte a všechnu tekutinu vytlačte přitisknutím tamponu na vnitřní stěnu zkumavky.
11. Jako vzorek pro přípravu lýzy mimo přístroj použijte 200 μ l předem upraveného materiálu.

Poznámka: Tento protokol je optimalizován na bavlněné nebo polyethylenové tampony. Při použití jiných tamponů je třeba upravit objem pufru ATL (ATL), aby se zajistilo, že bude k dispozici nejméně 200 μ l materiálu vzorku.

Respirační nebo urogenitální stěry

Skladovací média pro respirační nebo urogenitální stěry lze použít bez předběžné úpravy. Pokud nebyl tampon se stěrem vyjmut, přitiskněte ho o stěnu zkumavky, aby se tekutina vytlačila. Současně je nutno jakýkoli přebytečný hlen ze vzorku odstranit jeho odběrem na tampon. Jakoukoli zbytkovou tekutinu z hlenu a tamponu je poté nutno vytlačit přitisknutím tamponu

* Sputasol (Oxoid, kat. č. SR0233, www.oxoid.com) nebo dithiotreitol (DTT).

† Nejedná se o kompletní seznam dodavatelů.

na stěnu zkumavky. Nakonec je nutno tampon se stěry a hlen vyjmout a zlikvidovat. Pokud jsou vzorky viskózní, proveďte před přenosem vzorku do přístroje QIASymphony SP krok zkapalnění (viz odstavec „Viskózní nebo hlenovité vzorky“ výše). Pokud nemáte dostatek počátečního materiálu, napipetujte do přepravního média pufr ATL (ATL), abyste tak upravili požadovaný minimální počáteční objem a vzorek ve zkumavce protřepávejte ve vortexu po dobu 15–30 sekund (pokud je v přepravním médiu tampon se stěry, tento krok proveďte před vyjmutím tamponu). Jako vzorek pro přípravu lýzy mimo přístroj použijte 200 µl materiálu.

Historie revizí

Historie revizí dokumentu	
R2 12/2017	Aktualizace pro software QIASymphony verze 5.0

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příslušné příručce pro sadu QIAGEN® nebo v příručce uživatele. Příručky k sadám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách www.qiagen.com nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (skupina QIAGEN). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, a to i v případě, že takto nejsou výslovně označeny, nejsou považovány za zákonem nechráněné.
12/2017 HB-0301-S27-002 © 2017 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

Objednávky www.qiagen.com/shop | Technická podpora support.qiagen.com | Webová stránka www.qiagen.com