

Prosinec 2017

List protokolu QIAasymphony[®] SP

Protokol Complex200_V6_DSP

Tento dokument představuje list protokolu Complex200_V6_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_V6_DSP
Výchozí kontrolní sada	ACS_Complex200_V6_DSP_default_IC
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 požitých 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 požitých 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 reagensy (Reagent cartridge, RC)
Poloha B1	Pufr ATL (ATL)
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

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†‡	34	60	86	112
Filtrační špičky k jednorázovému použití, 1500 µl†‡	123	205	295	385
Zásobníky pro přípravu vzorků§	18	36	54	72
8hrotové kryty¶	3	6	9	12

* Užití více než jedné interní kontroly na jednu sadu a provedení více než jednoho inventárního skenu vyžaduje dodatečně jednorázové špičky s filtrem. 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 reagenty.

§ 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 zkuševky na vzorek; další informace viz www.qiagen.com/goto/dsphanbooks.

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.

Zkuševky obsahující směs interní kontroly, nosičové RNA (CARRIER) a pufru AVE (AVE) jsou umístěny v nosiči zkuševky. Nosič zkuševky obsahující směs(i) interní kontroly, nosičové RNA (CARRIER) a pufru AVE (AVE) musí být umístěn do drážky A zásuvky pro vzorky.

Podle počtu vzorků, které se budou zpracovávat, doporučujeme na ředění interní kontroly použít 2 ml zkuševky (Sarstedt, kat. č. 72.693 nebo 72.694) nebo 14 ml, 17 x 100 mm polystyrénové zkuševky s kulatým dnem (Becton Dickinson, kat. č. 352051), jak je uvedeno v tabulce níže. Objem lze rozdělit do 2 nebo více zkuševky.

Výpočet objemu směsi interní kontroly

Typ zkumavky	Název na dotykové obrazovce QIASymphony	Výpočet objemu směsi interní kontroly – nosičové RNA (CARRIER) – pufru AVE (AVE) na zkumavku
Mikrozkumavka 2 ml s víčkem; mikrozkumavka 2 ml, PP, OLEMOVANÁ, (Sarstedt, kat. č. 72.694)	SAR#72.694 T2.0 ScrewSkirt	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l}^*$
Mikrozkumavka 2 ml s víčkem; mikrozkumavka 2 ml, PP, NEOLEMOVANÁ, (Sarstedt, kat. č. 72.693)	SAR#72.693 T2.0 Screw	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l}^*$
Zkumavka 14 ml, 17 x 100 mm, polystyrénová s kulatým dnem (Becton Dickinson, kat. č. 352051)	BD#352051 FalconPP 17x100	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 600 \mu\text{l}^\dagger$

* Tuto rovnici použijte na výpočet požadovaného objemu směsi interní kontroly (n = počet vzorků; $120 \mu\text{l}$ = objem směsi interní kontroly, nosičové RNA (CARRIER) a pufru AVE (AVE); $360 \mu\text{l}$ = mrtvý objem na zkumavku). Například pro 12 vzorků ($n = 12$): $(12 \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l} = 1800 \mu\text{l}$. Do zkumavky neplňte více než 1,9 ml (tj. maximálně 12 vzorků na zkumavku). Pokud se bude zpracovávat více než 12 vzorků, použijte další zkumavky a dbejte na to, aby byl do každé zkumavky přidán mrtvý objem.

† Tuto rovnici použijte na výpočet požadovaného objemu směsi interní kontroly, nosičové RNA (CARRIER) a pufru AVE (AVE) (n = počet vzorků; $120 \mu\text{l}$ = objem směsi interní kontroly, nosičové RNA (CARRIER) a pufru AVE (AVE); $600 \mu\text{l}$ = mrtvý objem na zkumavku). Například pro 96 vzorků ($n = 96$): $(96 \times 120 \mu\text{l}) + 600 \mu\text{l} = 12120 \mu\text{l}$.

Požadované vložky viz www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Použití laboratorního vybavení FIX

Při použití detekce hladiny tekutiny (liquid-level detection, LLD) na přenos vzorků je možno používat primární (odběrové) a sekundární zkumavky. V tom případě však musí být v příslušných zkumavkách určité mrtvé objemy. K minimalizaci mrtvých objemů je nutno použít sekundární zkumavky bez detekce hladiny tekutiny. K dispozici je specifické laboratorní vybavení FIX (např. SAR_FIX_#72.694 T2.0 ScrewSkirt), které lze zvolit i na dotykové obrazovce QIASymphony SP. Tento typ zkumavek/stojanů přináší omezení pro odsávání. Vzorek se odsává v dané výšce ve zkumavce, která je definována objemem přenášeného vzorku. Proto se musí použít objem uvedený v seznamu laboratorního vybavení. Seznamy laboratorního vybavení ke stažení jsou na stránce www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Na stránce www.qiagen.com/goto/dsphandbooks jsou uvedeny i zkumavky na vzorky, které lze použít s detekcí hladiny tekutiny nebo bez ní a požadované objemy vzorků. Nepoužívejte větší nebo menší než požadované objemy, jelikož to může vést k chybám při přípravě vzorku.

Zkumavky pro detekci hladiny tekutiny a zkumavky, které nejsou určeny pro detekci hladiny tekutiny, lze zpracovávat v jedné šarži/cyklu.

Příprava materiálu vzorků

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.

Moč

Moč lze zpracovávat bez další předběžné úpravy. Vzorek přeneste do 2 ml zkumavky Sarstedt (kat. č. 72.693 nebo 72.694) a vzorek umístěte do nosiče zkumavek. Případně lze použít primární zkumavky. Požadovaný minimální počáteční objem se může lišit v závislosti na použité primární zkumavce. Kompatibilní formáty primárních a sekundárních zkumavek, včetně minimálního počátečního objemu nutného pro každý protokol, jsou uvedeny na stránce www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. 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 300 µl pufru ATL (ATL) (kat. č. 939016). Přeneste 220 µl vzorku do 2 ml zkumavky Sarstedt (kat. č. 72.693 nebo 72.694). Vzorek uložte do nosiče zkumavek a zpracujte podle protokolu Complex200_V6_DSP a pomocí potřebného laboratorního vybavení FIX.

Izolace genomové DNA z gram-pozitivních bakterií

U některých gram-pozitivních bakterií lze před přenosem vzorku do přístroje QIASymphony SP a zahájením protokolu Complex200_V6_DSP purifikaci DNA zlepšit enzymatickou předběžnou úpravou.

1. Bakterie oddělte odstředováním při 5000 x g po dobu 10 minut.
2. Bakteriální peletu suspendujte v 300 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. Vzorek přeneste do 2 ml zkumavky Sarstedt (kat. č. 72.693 nebo 72.694), vzorek umístěte do nosiče zkumavek a pokračujte podle protokolu Complex200_V6_DSP pomocí potřebného laboratorního vybavení FIX.

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% (hm.) roztok DTT lze připravit předem a skladovat v alikvotních podílech při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po použití roztáté alikvoty zlikvidujte.
7. Inkubujte při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, dokud nebude viskozita vhodná pro pipetování.
8. Přeneste nejméně 300 μl vzorku do 2 ml zkumavky Sarstedt (kat. č. 72.693 nebo 72.694). Vzorek zpracujte podle protokolu Complex200_V6_DSP.

Sušené stěry tělesných tekutin a sekretů

9. Špičku se sušeným stěrem ponořte do 550 μl pufru ATL (ATL) (kat. č. 939016) a za trvalého míchání inkubujte při teplotě $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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. Přeneste nejméně 300 μl vzorku do 2ml zkumavky Sarstedt (kat. č. 72.693 nebo 72.694). Vzorek zpracujte podle protokolu Complex200_V6_DSP.
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 300 μl 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 vytlačila tekutina. Současně je nutno jakýkoli přebytečný hlen ze vzorku odstranit jeho odběrem na tampon. Jakoukoli zbytkovou tekutinu z hleny a tamponu je poté nutno vytlačit přitisknutím tamponu se stěrem 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

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

† Nejedná se o kompletní seznam dodavatelů.

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). Vzorek přeneste do 2 ml zkumavky Sarstedt (kat. č. 72.693 nebo 72.694) a vzorek umístěte do nosiče zkumavek. Případně lze použít primární zkumavky. Požadovaný minimální počáteční objem se může lišit v závislosti na použité primární zkumavce. Kompatibilní primární a sekundární zkumavky, včetně minimálního počátečního objemu nutného pro každý protokol, jsou uvedeny na stránce www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

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 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-S26-002 © 2017 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

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