

Grudzień 2017

Karta protokołu QIAasymphony[®] SP

Protokół Complex200_OBL_V4_DSP

Niniejszy dokument to *karta protokołu QIAasymphony SP Complex200_OBL_V4_DSP R2* dla zestawu QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit, wersja 1.

Informacje ogólne

Zestaw QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit jest przeznaczony do diagnostyki in vitro.

Zestaw	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit
Materiał próbki	Próbki z dróg oddechowych lub układu moczowo-płciowego
Nazwa protokołu	Complex200_OBL_V4_DSP
Domyślny zestaw ustawień kontrolnych badania	ACS_Complex200_OBL_V4_DSP
Możliwość dostosowania	Objętość eluatu: 60 µl, 85 µl, 110 µl
Wymagana wersja oprogramowania	Wersja 4.0 lub wyższa

Szuflada „Sample” (Próbka)

Typ próbki	Próbki z dróg oddechowych (z płukania oskrzelowo-płucnego, osuszonych wymazówek, podłoża transportowego, aspiraty, flegma) i z układu moczowo-płciowego (mocz, z podłoża transportowego)
Objętość próbki	Zależy od typu używanej próbki; więcej informacji znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Próbki pierwotne	Więcej informacji znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Próbki dodatkowe	Więcej informacji znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Wkłady	Zależy od typu używanej próbki; więcej informacji znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Inne	Wymagana mieszanina nośnik RNA–bufor AVE; użycie kontroli wewnętrznej jest opcjonalne

Szuflada „Reagents and Consumables” (Odczynniki i materiały eksploatacyjne)

Pozycja A1 i/lub A2	Kartridż z odczynnikiem (reagent cartridge, RC)
Pozycja B1	nd.
Uchwyt na statyw na końcówki 1–17	Jednorazowe końcówki z filtrem, 200 µl
Uchwyt na statyw na końcówki 1–17	Jednorazowe końcówki z filtrem, 1500 µl
Uchwyt na opakowanie jednostkowe 1–4	Opakowania jednostkowe zawierające kartridże sample prep
Uchwyt na opakowanie jednostkowe 1–4	Opakowania jednostkowe zawierające zamknięcia 8-szyftowe

nd. = nie dotyczy

Szuflada „Waste” (Odpady)

Uchwyt na opakowanie jednostkowe 1–4	Puste opakowania jednostkowe
Uchwyt na worek na odpady	Worek na odpady
Uchwyt na butlę na odpady płynne	Butla na odpady płynne

Szuflada „Eluate” (Eluat)

Statyw elucji (zalecamy używanie gniazda 1, pozycji chłodzenia)	Więcej informacji znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
---	--

Wymagany sprzęt z tworzywa sztucznego

	Jedna partia, 24 próbki*	Dwie partie, 48 próbek*	Trzy partie, 72 próbki*	Cztery partie, 96 próbek*
Jednorazowe końcówki z filtrem, 200 µl ^{††}	96	96	128	128
Jednorazowe końcówki z filtrem, 1500 µl ^{††}	128	192	224	288
Kartridże sample prep [§]	18	36	54	72
Zamknięcia 8-szyftowe [¶]	3	6	9	12

* Do przeprowadzenia więcej niż jednego skanowania inwentaryzującego wymagane są dodatkowe jednorazowe końcówki z filtrem. W przypadku używania mniej niż 24 próbek na jedną partię zmniejsza się liczbę jednorazowych końcówek wymaganych na cykl.

[†] Statyw na końcówki zawiera 32 końcówki z filtrem.

[‡] Liczba wymaganych końcówek z filtrem obejmuje końcówki z filtrem dla 1 skanowania inwentaryzującego na kartridż z odczynnikami.

[§] Opakowanie jednostkowe zawiera 28 kartridży sample prep.

[¶] Opakowanie jednostkowe zawiera dwanaście zamknięć 8-szyftowych.

Uwaga: W zależności od ustawień, na przykład liczby kontroli wewnętrznych używanych na partię, podane liczby końcówek z filtrem mogą się różnić od liczb wyświetlanych na ekranie dotykowym.

Wybrana objętość elucji

Wybrana objętość elucji (µl)*	Początkowa objętość elucji (µl) [†]
60	90
85	115
110	140

* Objętość elucji wybrana na ekranie dotykowym. Jest to minimalna dostępna objętość eluatu w końcowej probówce elucji.

[†] Początkowa objętość roztworu elucji wymagana do zapewnienia właściwej objętości eluatu, równej wcześniej wybranej wartości.

Przygotowanie mieszaniny kontrola wewnętrzna-nośnik RNA (CARRIER)-bufor AVE (AVE)

Wybrana objętość elucji (µl)	Objętość roztworu podstawowego nośnika RNA (CARRIER) (µl)	Objętość kontroli wewnętrznej (µl)*	Objętość buforu AVE (AVE) (µl)	Końcowa objętość na próbkę (µl)
60	3	9	108	120
85	3	11,5	105,5	120
110	3	14	103	120

* Obliczenie ilości kontroli wewnętrznej opiera się na początkowych objętościach elucji. Dodatkowa objętość nieużyteczna zależy od typu użytej próbówki; więcej informacji znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Uwaga: Wartości widoczne w tabeli służą do przygotowania mieszaniny kontrola wewnętrzna-nośnik RNA (CARRIER) dla dalszej analizy, w której wymagane jest 0,1 µl kontroli wewnętrznej na µl eluatu.

Liza poza aparatem

W czasie pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. Więcej informacji można znaleźć w odpowiednich kartach charakterystyki substancji niebezpiecznych (material safety data sheets, MSDS), dostępnych u dostawcy produktu.

Protokoły QIASymphony Complex składają się z 4 etapów: liza, wiązanie, płukanie, elucja. Dla niektórych próbek warto ręcznie wykonać lizę, na przykład w celu inaktywacji patogenów w komorze bezpieczeństwa biologicznego. Protokół Complex200_OBL_V4_DSP umożliwia ręczne wykonanie lizy w sposób podobny jak w przypadku protokołu Complex200_V6_DSP. Wstępnie przygotowane próbki są przenoszone do aparatu QIASymphony SP i przetwarzane za pomocą protokołu Complex200_OBL_V4_DSP.

Uwaga: Do wykonania protokołu Complex200_OBL_V4 wymagany jest bufor ACL i bufor ATL (ATL). Bufor ACL (nr kat. 939017) i bufor ATL (ATL) (nr kat. 939016) nie są częścią zestawu QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini i należy je zamówić osobno.

Ręczne wykonanie lizy

1. Za pomocą pipety przenieść 20 µl proteinazy K, 100 µl buforu ATL (ATL), 120 µl mieszaniny kontroli wewnętrznej i nośnika RNA oraz 190 µl buforu ACL do probówki Sarstedt o pojemności 2 ml (nr kat. 72.693 lub 72.694).

Uwaga: Jeśli podczas lizy wykonywanej ręcznie będzie przetwarzana więcej niż jedna próbka, można przygotować roztwór podstawowy tej mieszaniny. Wystarczy pomnożyć objętości wymagane na jedną próbkę przez łączną liczbę próbek, które mają zostać przetworzone, oraz uwzględnić dodatkową objętość odpowiadającą 2 dodatkowym próbkom. Odwrócić probówkę kilka razy, aby wymieszać jej zawartość, przenieść po 430 µl do probówki Sarstedt o pojemności 2 ml dla każdej próbki, a następnie kontynuować proces dla każdej próbki, przechodząc do etapu 4.

2. Zamknąć wieczko i wymieszać, odwracając probówkę 5 razy.
3. Odwirować krótko probówkę w celu usunięcia kropli z wewnętrznej części wieczka.
4. Dodać 200 µl próbki do probówki, zamknąć wieczko i dokładnie wymieszać, wytrząsając pulsacyjnie przez 10 sekund.
5. Inkubować probówkę w temperaturze 68°C przez 15 minut (\pm 1 minuta).
6. Odwirować krótko probówkę w celu usunięcia kropli z wewnętrznej części wieczka.
7. Umieścić wkłady dla odpowiednich próbek w nośniku próbek, a następnie załadować probówki (bez wieczek).

Przygotowanie materiału próbki

Mocz

Próbki moczu można przetwarzać bez dalszego wstępnego przygotowania. System jest zoptymalizowany dla próbek czystego moczu, które nie zawierają środków konserwujących. Aby zwiększyć czułość wykrywania patogenów bakteryjnych, można odwirować próbki. Po odrzuceniu supernatantu osad można zawiesić w co najmniej 200 µl buforu ATL (ATL) (nr kat. 939016). Użyć 200 µl wstępnie przygotowanego materiału jako próbki do przygotowania lizy poza aparatem.

Izolacja genomowego DNA z bakterii Gram-dodatnich

Proces oczyszczania DNA można ulepszyć dla niektórych bakterii Gram-dodatnich, wykonując wstępną obróbkę enzymatyczną próbki przed przeniesieniem jej do aparatu QIASymphony SP i rozpoczęciem protokołu Complex200_OBL_V4_DSP.

1. Strącić bakterie, wirując próbkę przy 5000 x g przez 10 minut.

2. Zawiesić osad bakteryjny w 200 µl odpowiedniego roztworu enzymu (lizozym o stężeniu 20 mg/ml lub lizostafina o stężeniu 200 µg/ml w buforze Tris·HCl o stężeniu 20 mM, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1,2% Triton X--100).
3. Inkubować w temperaturze 37°C przez co najmniej 30 minut (± 2 minuty).
4. Odwirować krótko próbkę w celu usunięcia kropli z wewnętrznej części wieczka.
5. Użyć 200 µl wstępnie przygotowanego materiału jako próbki do przygotowania lizy poza aparatem.

Próbki lepkie lub próbki ze śluzem

Niektóre próbki (np. flegma, aspiraty z dróg oddechowych) mogą być lepkie i wymagać upłynnienia, aby było możliwe ich pipetowanie. Próbki o małej lepkości nie wymagają dodatkowego przygotowania. Próbki o od średniej do dużej lepkości należy przygotować w następujący sposób:

1. Rozcieńczyć próbkę w stosunku 1:1 odczynnikiem Sputasol*[†] (Oxoid, nr kat. SR0233) lub 0,3-procentowym (w/v) roztworem DTT.

Uwaga: 0,3-procentowy roztwór DTT można przygotować wcześniej i przechowywać w temperaturze –20°C w porcjach o odpowiedniej objętości. Rozmrożone porcje należy wyrzucić po użyciu.

2. Inkubować w temperaturze 37°C do momentu, gdy lepkość próbki będzie umożliwiała pipetowanie.
3. Użyć 200 µl wstępnie przygotowanego materiału jako próbki do przygotowania lizy poza aparatem.

Osuszone wymazówki z płynami ustrojowymi i wydzielinami

1. Zanurzyć końcówkę osuszonej wymazówki w 450 µl buforu ATL (ATL) (nr kat. 939016) i inkubować w temperaturze 56°C przez 15 minut (± 1 minuta) z ciągłym mieszaniem. Jeśli mieszanie nie jest możliwe, przed i po inkubacji wytrząsać przez co najmniej 10 sekund.
2. Wyciągnąć wymazówkę i odcisnąć cały płyn, przyciskając wymazówkę do wewnętrznej ścianki próbki.
3. Użyć 200 µl wstępnie przygotowanego materiału jako próbki do przygotowania lizy poza aparatem.

* Sputasol (Oxoid, nr kat. SR0233, www.oxoid.com) lub ditiotreitól (DTT).

† Nie jest to pełna lista dostawców.

Uwaga: Protokół jest zoptymalizowany dla wymazówek bawełnianych lub wykonanych z polietylenu. W przypadku używania innych wymazówek może być konieczne dostosowanie objętości buforu ATL (ATL), aby zagwarantować, że co najmniej 200 µl będzie dostępne jako materiał próbki.

Wymazówki do dróg oddechowych lub układu moczowo-płciowego

Podłoża transportowego dla wymazówek do dróg oddechowych lub układu moczowo-płciowego można używać bez wstępnego przygotowania. Jeśli nie wyciągnięto wymazówki, przycisnąć wymazówkę do ścianki próbki, aby odcisnąć płyn. Na tym etapie należy usunąć wszelki nadmiar śluzu znajdujący się w próbce, zbierając go na wymazówkę. Następnie należy odcisnąć pozostałości płynu ze śluzu, przyciskając wymazówkę do ścianki próbki. Na końcu należy wyciągnąć i zutylizować wymazówkę ze śluzem. Jeśli próbki są lepkie, przed przeniesieniem ich do aparatu QIASymphony SP należy wykonać etap upłynniania (patrz część „Próbki lepkie lub próbki ze śluzem” powyżej). Jeśli nie ma wystarczającej ilości materiału początkowego, przenieść bufor ATL (ATL) za pomocą pipety do podłoża transportowego do wymaganej minimalnej objętości początkowej i wytrząsać próbkę w próbce przez 15–30 sekund (jeśli w podłożu transportowym znajduje się wymazówka, wykonać ten etap przed wyciągnięciem wymazówki). Użyć 200 µl materiału jako próbki do przygotowania lizy poza aparatem.

Historia zmian

Historia zmian dokumentu	
R2 12/2017	Aktualizacja dla wersji 5.0 oprogramowania QIASymphony

Aktualne informacje licencyjne oraz wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN®. Instrukcje obsługi lub podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie technicznym lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.
12/2017 HB-0301-S27-002 © 2017 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

Składanie zamówień www.qiagen.com/shop | Pomoc techniczna support.qiagen.com | Strona WWW www.qiagen.com