
Grudzień 2017

Karta protokołu QIAasymphony[®] SP

Protokół Complex400_V4_DSP

Niniejszy dokument to *karta protokołu QIAasymphony SP Complex400_V4_DSP R2* dla zestawu QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, wersja 1.

Informacje ogólne

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

Zestaw	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit
Materiał próbki	Próbki z dróg oddechowych lub układu moczowo-płciowego
Nazwa protokołu	Complex400_V4_DSP
Domyślny zestaw ustawień kontrolnych badania	ACS_Complex400_V4_DSP_default_IC
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 probówki; więcej informacji znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Probówki pierwotne	Więcej informacji znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Probówki dodatkowe	Więcej informacji znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Wkłady	Zależy od typu używanej probówki; 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	Bufor ATL (ATL)
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

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†‡	34	60	86	112
Jednorazowe końcówki z filtrem, 1500 µl†‡	123	205	295	385
Kartridże sample prep§	18	36	54	72
Zamknięcia 8-szyftowe¶	3	6	9	12

* Użycie więcej niż jednej kontroli wewnętrznej na jedną partię oraz przeprowadzenie więcej niż jednego skanowania inwentaryzującego wymaga dodatkowych jednorazowych końcówek z filtrem. W przypadku używania mniej niż 24 próbek na jedną partię zmniejsza się liczba jednorazowych końcówek z filtrem 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 odczytnikami.

§ 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 próbówce 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 próbki; 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.

Próbki zawierające mieszaninę kontrola wewnętrzna-nośnik RNA (CARRIER)-bufor AVE (AVE) umieszcza się w nośniku próbek. Nośnik próbek zawierający mieszaninę(-ny) kontrola wewnętrzna-nośnik RNA (CARRIER)-bufor AVE (AVE) należy umieścić w gnieździe A szuflady „Sample” (Próbka).

W zależności od liczby przetwarzanych próbek zalecamy używanie próbek o pojemności 2 ml (Sarstedt, nr kat. 72.693 lub 72.694) lub próbek polistyrenowych z okrągłym dnem 17 x 100 mm o pojemności 14 ml (Becton Dickinson, nr kat. 352051) w celu rozcieńczenia kontroli wewnętrznej w sposób opisany w poniższej tabeli. Objętość można podzielić na 2 lub więcej próbek.

Obliczanie objętości mieszaniny kontroli wewnętrznej

Typ próbówki	Nazwa wyświetlona na ekranie dotykowym aparatu QIASymphony	Obliczenie objętości mieszaniny kontrola wewnętrzna-nośnik RNA (CARRIER)-bufor AVE (AVE) na próbówkę
Mikropróbówka 2 ml z wieczkiem, mikropróbówka 2 ml, PP, STOŻKOWE DNO W KOŁNIERZU PRZEDŁUŻAJĄCYM (Sarstedt, nr kat. 72.694)	SAR#72.694 T2.0 ScrewSkirt	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l}^*$
Mikropróbówka 2 ml z wieczkiem, mikropróbówka 2 ml, PP, BEZ STOŻKOWEGO DNA W KOŁNIERZU PRZEDŁUŻAJĄCYM (Sarstedt, nr kat. 72.693)	SAR#72.693 T2.0 Screw	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l}^*$
Próbówka 14 ml, 17 x 100 mm polistyrenowa z okrągłym dnem (Becton Dickinson, nr kat. 352051)	BD#352051 FalconPP 17x100	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 600 \mu\text{l}^\dagger$

* To równanie służy do obliczenia wymaganej objętości mieszaniny kontroli wewnętrznej (n = liczba próbek; $120 \mu\text{l}$ = objętość mieszaniny kontrola wewnętrzna-nośnik RNA (CARRIER)-bufor AVE (AVE); $360 \mu\text{l}$ = objętość nieużyteczna wymagana na każdą próbówkę). Na przykład dla 12 próbek ($n = 12$): $(12 \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l} = 1800 \mu\text{l}$. Nie napelniać próbówki do objętości większej niż 1,9 ml (tj. maksymalnie 12 próbek na próbówkę). Jeśli będzie przetwarzanych więcej niż 12 próbek, użyć dodatkowych próbek, upewniając się, że objętość nieużyteczna została dodana do każdej próbówki.

† To równanie służy do obliczenia wymaganej objętości mieszaniny kontrola wewnętrzna-nośnik RNA (CARRIER)-bufor AVE (AVE) (n = liczba próbek; $120 \mu\text{l}$ = objętość mieszaniny kontrola wewnętrzna-nośnik RNA (CARRIER)-bufor AVE (AVE); $600 \mu\text{l}$ = objętość nieużyteczna wymagana na każdą próbówkę). Na przykład dla 96 próbek ($n = 96$): $(96 \times 120 \mu\text{l}) + 600 \mu\text{l} = 12120 \mu\text{l}$.

Informacje o wymaganych wkładach znajdują się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Korzystanie ze sprzętu laboratoryjnego FIX

Korzystanie z wykrywania poziomu płynu (liquid-level detection, LLD) podczas przenoszenia próbek, umożliwia stosowanie próbek pierwotnych i dodatkowych. Jednak w takim przypadku w odpowiednich probówkach wymagane są określone objętości martwe. Aby zminimalizować objętości martwe, należy używać próbek dodatkowych bez wykrywania poziomu płynu. Dostępny jest określony sprzęt laboratoryjny FIX (np. SAR_FIX_#72.694 T2.0 ScrewSkirt), który można również wybrać na ekranie dotykowym aparatu QIASymphony SP. Ten typ próbówki/statywu nakłada ograniczenia na aspirację. Próbka jest aspirowana na określonej wysokości próbówki, która jest zdefiniowana przez objętość przenoszonej próbki. Z tego względu kluczowe jest upewnienie się, że stosowana jest objętość wymieniona na liście sprzętów laboratoryjnych. Listy sprzętów laboratoryjnych można pobrać ze strony www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Probówki, których można użyć z wykrywaniem poziomu płynu lub bez takiego wykrywania, oraz wymagane objętości próbek są również wymienione na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Nie stosować objętości większych lub mniejszych od wymaganej objętości, gdyż może to prowadzić do błędów podczas przygotowania próbki.

W jednej partii/cyklu można przetwarzać próbki przeznaczone do użytku z wykrywaniem poziomu płynu lub bez takiego wykrywania.

Przygotowanie materiału próbki

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.

Mocz

Próbki moczu można przetwarzać bez dalszego wstępnego przygotowania. Przenieść próbkę do probówki Sarstedt o pojemności 2 ml (nr kat. 72.693 lub 72.694) i umieścić próbkę w nośniku próbek. Można również użyć probówek pierwotnych. Wymagana minimalna objętość początkowa może się różnić w zależności od używanej probówki pierwotnej. Zgodne formaty probówek pierwotnych i dodatkowych, w tym minimalna objętość początkowa wymagana dla każdego protokołu, są wymienione na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. 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 500 µl buforu ATL (ATL) (nr kat. 939016). Przenieść próbkę do probówki Sarstedt o pojemności 2 ml (nr kat. 72.693 lub 72.694). Umieścić próbkę w nośniku probówek i przetworzyć próbkę, stosując protokół Complex400_V4_DSP i wymagany sprzęt laboratoryjny FIX.

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 QIAasymphony SP i rozpoczęciem protokołu Complex400_V4_DSP.

1. Strącić bakterie, wirując próbkę przy 5000 x g przez 10 minut.
2. Zawiesić osad bakteryjny w 500 µl odpowiedniego roztworu enzymu (lizozym o stężeniu 20 mg/ml lub lizostafina o stężeniu 200 µg/ml; 20 mM bufor Tris·HCl, 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. Przenieść próbkę do próbki Sarstedt o pojemności 2 ml (nr kat. 72.693 lub 72.694), umieścić próbkę w nośniku próbek i kontynuować wykonywanie protokołu Complex400_V4_DSP, stosując odpowiedni sprzęt laboratoryjny FIX.

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 (w/v) roztwór DTT można przygotować wcześniej i przechowywać w porcjach w temperaturze –20°C. Rozmrożone porcje należy wyrzucić po użyciu.
2. Inkubować w temperaturze 37°C do momentu, gdy lepkość próbki będzie umożliwiała pipetowanie.
3. Przenieść co najmniej 500 µl próbki do próbki Sarstedt o pojemności 2 ml (nr kat. 72.693 lub 72.694). Przetworzyć próbkę, stosując protokół Complex400_V4_DSP.

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

† Nie jest to pełna lista dostawców.

Osuszone wymazówki z płynami ustrojowymi i wydzielinami

1. Zanurzyć końcówkę osuszonej wymazówki w 750 µl buforu ATL (ATL) (nr kat. 939016) i inkubować w temperaturze 56°C przez 15 minut (\pm 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 probówki.
3. Przenieść co najmniej 500 µl próbki do probówki Sarstedt o pojemności 2 ml (nr kat. 72.693 lub 72.694). Przetworzyć próbkę, stosując protokół Complex400_V4_DSP.

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 500 µl będzie dostępne jako materiał próbki.

Wymazówki do dróg oddechowych lub układu moczowo-płciowego przechowywane w podłożu transportowym

Podłoża transportowego dla wymazówek do dróg oddechowych lub układu moczowo-płciowego można używać bez wstępnego przygotowania. Jeśli nie wyciągnięto wymazówki, przycisnąć wymazówkę do ścianki probówki, aby odcisnąć płyn. Na tym etapie należy usunąć wszelki nadmiar śluzu znajdujący się w próbce, zbierając go na wymazówkę. Następnie należy odcisnąć pozostałości płynu od śluzu, przyciskając wymazówkę do ścianki probówki. Na końcu należy wyciągnąć i zutylizować wymazówkę ze śluzem. Jeśli próbki są lepkie, przed przeniesieniem ich do aparatu QIAAsymphony 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 probówce przez 15–30 sekund (jeśli w podłożu transportowym znajduje się wymazówka, wykonać ten etap przed wyciągnięciem wymazówki). Przenieść próbkę do probówki Sarstedt o pojemności 2 ml (nr kat. 72.693 lub 72.694) i umieścić próbkę w nośniku próbek. Można również użyć probówek pierwotnych. Wymagana minimalna objętość początkowa może się różnić w zależności od używanej probówki pierwotnej. Zgodne probówki pierwotne i dodatkowe, w tym minimalna objętość początkowa wymagana dla każdego protokołu, są wymienione na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

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-S28-002 © 2017 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

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