

Fiche de protocole QIASymphony SP

Protocole Complex800_V6_DSP

Informations générales

Remarque : Pour utilisation en diagnostic *in vitro*.

Kit	Kit QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi
Support de l'échantillon	Échantillons respiratoires et urogénitaux
Nom du protocole	Complex800_V6_DSP
Set témoin d'analyse par défaut	ACS_Complex800_V6_DSP_default_IC
Données	Volume d'éluat : 60 µl, 85 µl, 110 µl
Version logicielle requise	Version 4.0

Tiroir à échantillons « Sample »

Type d'échantillon	Échantillons respiratoires (LBA, prélèvements secs, milieux de transport, aspirations, salive) et échantillons urogénitaux (urine, milieux de transport)
Volume d'échantillon	Dépend du type de tube utilisé pour l'échantillon ; pour en savoir plus, consulter la page www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Tubes primaires d'échantillon	Pour en savoir plus, consulter la page www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Tubes secondaires d'échantillon	Pour en savoir plus, consulter la page www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Inserts	Dépend du type de tube utilisé pour l'échantillon ; pour en savoir plus consulter la page www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Autre	Tampon AVE avec solution d'ARN nécessaire ; l'utilisation d'une solution témoin est facultative



Sample & Assay Technologies

Mars 2012

Tiroir à réactifs et consommables « Reagents and Consumables »

Position A1 et/ou A2	Cartouches de réactif (RC)
Position B1	Tampon ATL (ATL)
Porte support des pointes 1 à 17	Pointes de filtres jetables, 200 μ l
Porte support des pointes 1 à 17	Filtres jetables, 1500 μ l
Porte boîte d'unités 1 à 4	Boîtes d'unités contenant des cartouches de préparation d'échantillon
Porte boîte d'unités 1 à 4	Boîtes d'unités contenant des manchons pour 8 barreaux

Tiroir à la poubelle « Waste »

Porte boîte d'unités 1 à 4	Boîtes d'unités vides
Support pour sac poubelle	Sac poubelle
Support pour bouteille à déchets liquides	Bouteille à déchets liquides

Tiroir à éluats «Eluate »

Support d'éluat (nous conseillons d'utiliser la fente 1, position refroidissement)	Pour en savoir plus, consulter la page www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
---	---

Éléments en plastique nécessaires

	Un lot, 24 échan- tillons*	Deux lots, 48 échan- tillons*	Trois lots, 72 échan- tillons*	Quatre lots, 96 échan- tillons*
Pointes de filtres jetables, 200 µl†‡	34	60	86	112
Pointes de filtres jetables, 1500 µl†‡	123	205	295	385
Cartouches de préparation d'échantillon§	18	36	54	72
Manchons pour 8 barreaux¶	3	6	9	12

* L'utilisation de plus d'une solution témoin par lot et la réalisation de plus d'un scan d'inventaire nécessite davantage de pointes de filtres jetables. Si vous utilisez moins de 24 échantillons par lot, réduisez le nombre de pointes de filtres jetables nécessaires par traitement.

† Il y a 32 pointes de filtres sur chaque support de pointes.

‡ Le nombre de pointes de filtres requises correspond à 1 scan d'inventaire par cartouche de réactif.

§ Il y a 28 cartouches de préparation d'échantillon par boîte d'unités.

¶ Il y a douze manchons pour 8 barreaux par boîte d'unité.

Remarque : Le nombre de pointes de filtres indiqué peut s'avérer différent du nombre affiché sur l'écran tactile, selon les paramètres, notamment le nombre de solutions témoins utilisées par lot.

Volume d'élution choisi

Volume d'élution choisi (µl)*	Volume d'élution initial (µl)*
60	90
85	115
110	140

* Le volume d'élution choisi sur l'écran tactile. Il correspond au volume minimum accessible d'éluat dans le tube d'élution final.

† Le volume initial de solution d'élution nécessaire pour assurer le même volume réel d'éluat que le volume choisi.

Préparation du mélange témoin interne-ARN entraîneur (CARRIER)-tampon AVE (AVE)

Volume d'éluat choisi (μ l)	Volume ARN entraîneur (CARRIER) (μ l)	Volume de solution témoin (μ l)*	Volume de tampon AVE (AVE) (μ l)	Volume final par échantillon (μ l)
60	3	9	108	120
85	3	11,5	105,5	120
110	3	14	103	120

* Le calcul de la quantité de solution témoin s'appuie sur les volumes d'éluat initiaux. Le volume mort supplémentaire dépend du type de tube utilisé pour l'échantillon ; pour en savoir plus, consulter la page www.qiagen.com/goto/dsphandbooks

Remarque : Les valeurs indiquées dans le tableau sont destinées à la préparation du mélange solution témoin-ARN entraîneur (CARRIER) pour une analyse en aval nécessitant 0,1 μ l de solution témoin/ μ l d'éluat.

Les tubes contenant le mélange témoin interne-ARN entraîneur (CARRIER)-tampon AVE (AVE) sont placés sur un porte-tubes. Ce porte-tubes doit être placé dans la fente A du tiroir à échantillons.

Selon le nombre d'échantillons à traiter, il est recommandé d'utiliser des tubes de 2 ml (Sarstedt, référence 72.693 ou 72.694) ou des tubes de 14 ml, 17 x 100 mm, en polystyrène, à fond rond (Becton Dickinson, référence 352051) pour diluer le témoin interne tel que décrit dans le tableau de la page 5. Il est possible de répartir le volume dans 2 tubes ou plus.

Calcul du volume du mélange de témoin interne

Type de tube	Nom sur l'écran tactile QIASymphony	Calcul du volume par tube du mélange témoin interne-ARN entraîneur (CARRIER)-tampon AVE (AVE)
Microtube de 2 ml muni d'un bouchon, microtube de 2 ml en PP, À COLLERETTE (Sarstedt, référence No. 72.694)	SAR#72.694 T2.0 ScrewSkirt	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l}^*$
Microtube de 2 ml muni d'un bouchon, microtube de 2 ml en PP, SANS COLLERETTE (Sarstedt, référence No. 72.693)	SAR#72.693 T2.0 Screw	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l}^*$
Tube de 14 ml, 17 x 100 mm, en polystyrène, à fond rond, (Becton Dickinson, référence 352051)	BD#352051 FalconPP 17x100	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 600 \mu\text{l}^\dagger$

* Utiliser cette équation pour calculer le volume nécessaire de mélange de témoin interne (n = nombre d'échantillons, $120 \mu\text{l}$ = volume de mélange témoin interne-ARN entraîneur (CARRIER)-tampon AVE (AVE), $360 \mu\text{l}$ = volume mort requis par tube). Exemple, pour 12 échantillons ($n = 12$) : $(12 \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l} = 1800 \mu\text{l}$. Ne pas verser dans le tube un volume supérieur à 1,9 ml (c'est-à-dire un maximum de 12 échantillons par tube). S'il y a plus de 12 échantillons à traiter, utiliser des tubes supplémentaires en veillant à prévoir un volume mort pour chaque tube.

† Utiliser cette équation pour calculer le volume nécessaire de mélange témoin interne-ARN entraîneur (CARRIER)-tampon AVE (AVE) (n = nombre d'échantillons, $120 \mu\text{l}$ = volume de mélange témoin interne-ARN entraîneur (CARRIER)-tampon AVE (AVE), $600 \mu\text{l}$ = volume mort requis par tube). Exemple, pour 96 échantillons ($n = 96$) : $(96 \times 120 \mu\text{l}) + 600 \mu\text{l} = 12\,120 \mu\text{l}$.

Pour les inserts nécessaires, voir www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Utilisation du matériel de laboratoire FIX

Le recours à la détection du niveau de liquide lors du transfert des échantillons permet d'utiliser des tubes principaux et des tubes secondaires. Toutefois, un certain volume mort est à respecter pour ces tubes. Afin de minimiser le volume mort, il convient d'utiliser des tubes secondaires sans détection du niveau de liquide. Le matériel de laboratoire spécial FIX est disponible à cet effet (par exemple, SAR_FIX_#72.694 T2.0 ScrewSkirt) et peut être sélectionné sur l'écran tactile du QIASymphony SP. Ce type de tube et de portoir impose des contraintes d'aspiration. L'échantillon

est aspiré à une hauteur particulière dans le tube, en fonction du volume d'échantillon à transférer. Par conséquent, il est crucial de s'assurer que le volume indiqué sur la liste du matériel de laboratoire est respecté. Les listes de matériel de laboratoire sont disponibles au téléchargement sur le site www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

La liste des tubes d'échantillon utilisables avec ou sans détection du niveau de liquide et des volumes requis sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Respecter le volume requis. Toute hausse ou baisse du volume peut entraîner des erreurs lors de la préparation des échantillons.

Les deux types de tubes (avec ou sans détection du niveau de liquide) peuvent être traités dans un même lot ou cycle.

Préparation des échantillons

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches techniques de données de sécurité (MSDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

Urine

L'urine peut être traitée sans prétraitement. Transférer l'échantillon dans un tube Sarstedt de 2 ml (références 72.693 ou 72.694), puis placer l'échantillon dans le porte-échantillon. Il est également possible d'utiliser des tubes primaires. Le volume d'amorce minimum requis peut varier, selon le tube primaire utilisé. Les formats des tubes primaires et secondaires, ainsi que le volume d'amorce minimum requis pour chaque protocole sont rassemblés dans une liste publiée à l'adresse suivante : www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Le système est optimisé pour les échantillons d'urine pure ne contenant aucun conservateur. Pour accroître la sensibilité aux pathogènes bactériens, les échantillons peuvent être centrifugés. Une fois le surnageant mis au rebut, le culot peut être remis en suspension dans une solution Tampon ATL (ATL) (référence 939016). Transférer l'échantillon dans un tube Sarstedt de 2 ml (références 72.693 ou 72.694). Placer l'échantillon sur un porte-tubes et le traiter selon le protocole Complex800_V6_DSP à l'aide du matériel de laboratoire FIX requis.

Isolation de l'ADN génomique à partir d'une bactérie à gram positif

Il est possible d'améliorer la purification de l'ADN pour certaines bactéries à gram positif au moyen d'un prétraitement réalisé avant le transfert de l'échantillon dans le QIASymphony SP et avant de lancer le protocole Complex800_V6_DSP.

- 1. Sédimer les bactéries par centrifugation à 5000 x g pendant 10 minutes.**
- 2. Placer le sédiment bactérien en suspension dans 900 µl de la solution enzymatique appropriée (20 mg/ml de lysozyme ou 200 µg/ml de lysostaphine ; 20 mM de Tris·HCl, pH 8,0 ; 2 mM d'EDTA ; 1,2 % de Triton X-100).**
- 3. Placer en incubation à 37 °C pendant au moins 30 minutes (± 2 minutes).**

4. Centrifuger brièvement pour évacuer les gouttelettes formées sur l'intérieur du couvercle.
5. Transférer l'échantillon dans un tube Sarstedt de 2 ml (références 72.693 ou 72.694), placer l'échantillon sur le porte-tubes et poursuivre le protocole Complex800_V6_DSP avec le matériel de laboratoire FIX requis.

Échantillons visqueux ou muqueux

Certains échantillons (comme les crachats ou les aspirations respiratoires) présentent une texture visqueuse et il convient de les liquéfier pour en permettre le pipetage. Les échantillons à faible viscosité ne nécessitent aucune préparation supplémentaire. Les échantillons à viscosité moyenne à élevée doivent être préparés comme suit.

1. Diluer l'échantillon dans une solution à 1:1 de Sputasol*[†] (Oxoid, référence SR0233) ou 0,3% (w/v) de DTT.
Remarque : Il est possible de préparer la solution de DTT à 0,3 % (w/v) à l'avance et de la conserver en aliquotes à -20 °C. Jeter les aliquotes décongelées après utilisation.
2. Faire incuber à 37 °C jusqu'à ce que la viscosité de l'échantillon convienne au pipetage.
3. Transférer au moins 900 µl de l'échantillon dans un tube Sarstedt de 2 ml (références 72.693 ou 72.694). Traiter l'échantillon au moyen du protocole Complex800_V6_DSP.

Fluide corporel séché et prélèvements de sécrétions

1. Plonger l'embout sec de l'écouvillon dans 1150 µl de solution tampon ATL (ATL) (référence 939016) et faire incuber à 56 °C pendant 15 minutes (± 1 minute), en mélangeant sans cesse. S'il n'est pas possible de mélanger, mélanger au vortex avant et après l'incubation pendant au moins 10 secondes.
2. Retirer l'écouvillon et en éliminer le liquide en le pressant contre la paroi interne du tube.
3. Transférer au moins 900 µl de l'échantillon dans un tube Sarstedt de 2 ml (références 72.693 ou 72.694). Traiter l'échantillon au moyen du protocole Complex800_V6_DSP.

Remarque : Ce protocole est optimisé pour les écouvillons en coton ou en polyéthylène. Si d'autres types d'écouvillons sont utilisés, il peut être nécessaire d'ajuster le volume du tampon ATL (ATL) afin d'assurer un minimum de 900 µl d'échantillon disponible.

* Sputasol (Oxoid, référence SR0233, www.oxoid.com) ou dithiothréitol (DTT).

† Cette liste de fournisseurs n'est pas exhaustive.

Prélèvements respiratoires ou urogénitaux

Les solutions de stockage des prélèvements respiratoires ou urogénitaux peuvent être utilisées sans prétraitement. Si l'écouvillon n'a pas été retiré, le presser contre la paroi du tube pour en extraire le liquide. Tout excès de mucus dans l'échantillon doit être à présent retiré à l'aide de l'écouvillon. Tout liquide résiduel du mucus ou de l'écouvillon doit être extrait en pressant l'écouvillon contre la paroi du tube. Pour finir, retirer, puis jeter l'écouvillon et le mucus. Si les échantillons sont visqueux, commencer par une étape de liquéfaction (voir « Échantillons visqueux ou muqueux » ci-dessus) avant de transférer l'échantillon dans le QIASymphony SP. Si la quantité d'échantillon de départ est insuffisante, pipeter le tampon ATL (ATL) dans le milieu de transport pour obtenir le volume de départ minimal requis et passer l'échantillon au vortex dans le tube pendant 15 à 30 secondes (si l'écouvillon est présent dans le milieu de transport, procéder à cette étape avant de le retirer). Transférer l'échantillon dans un tube Sarstedt de 2 ml (références 72.693 ou 72.694), puis placer l'échantillon dans le porte-échantillon. Il est également possible d'utiliser des tubes primaires. Le volume d'amorce minimum requis peut varier, selon le tube primaire utilisé. Les tubes primaires et secondaires compatibles, ainsi que le volume d'amorce minimum requis pour chaque protocole sont rassemblés dans une liste publiée à l'adresse suivante : www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Pour obtenir des informations à jour et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN respectifs. Les manuels QIAGEN sont à demander auprès du support technique QIAGEN, ou bien à votre distributeur QIAGEN local. Il est possible de télécharger un certain nombre de manuels à cette adresse : www.qiagen.com/literature. Les fiches techniques de données de sécurité (MSDS) correspondant aux produits QIAGEN peuvent être téléchargées à l'adresse suivante : www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx.

Marques de commerce : QIAGEN®, QIASymphony® (Groupe QIAGEN). Les noms enregistrés, les marques déposées etc., utilisés dans ce document, même si non mentionnés comme tels ne peuvent être considérés comme non protégés juridiquement.

© 2012 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

Australia ■ 1-800-243-800

Austria ■ 0800/281010

Belgium ■ 0800-79612

Canada ■ 800-572-9613

China ■ 021-51345678

Denmark ■ 80-885945

Finland ■ 0800-914416

France ■ 01-60-920-930

Germany ■ 02103-29-12000

Hong Kong ■ 800 933 965

Ireland ■ 1800 555 049

Italy ■ 800 787980

Japan ■ 03-5547-0811

Korea (South) ■ 1544 7145

Luxembourg ■ 8002 2076

The Netherlands ■ 0800 0229592

Norway ■ 800-18859

Singapore ■ 65-67775366

Spain ■ 91-630-7050

Sweden ■ 020-790282

Switzerland ■ 055-254-22-11

UK ■ 01293-422-911

USA ■ 800-426-8157

