ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ KIT **ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ** ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ***LEGIONELLA PNEUMOPHILA***

Το kit της Nanoplasmas διατίθεται σε δύο εκδόσεις: L1 για ανάλυση ενός δείγματος και L5 για ανάλυση πέντε δειγμάτων.

Περιεχόμενα του Kit ανίχνευσης (L1)

1. 1 σύριγγα των 50ml
2. 1 σύριγγα των 10ml
3. 1 σύριγγα του 1ml
4. 1 φίλτρο σύριγγας
5. 1 σακουλάκι με ένδειξη «Empty tubes for sample collection» με 1 κενό φιαλίδιο
6. 1 σακουλάκι με ένδειξη «Nanoplasmas detection chip» με το chip ανίχνευσης
7. 1 φιαλίδιο με «Solution A»
8. 1 φιαλίδιο με «Solution B»
9. 1 σακουλάκι με την ένδειξη «Solution B1&B2 and Reg. mix B1&B2» που περιέχει τα φιαλίδια: «Solution B1», «Solution B2», Reg. mix B1» και «Reg. mix B2»
10. Στρογγυλά αυτοκόλλητα σφράγισης

Περιεχόμενα του Kit ανίχνευσης (L5)

1. 5 σύριγγες των 50ml
2. 5 σύριγγες των 10ml
3. 5 σύριγγες του 1ml
4. 5 φίλτρα σύριγγας
5. 1 σακουλάκι με ένδειξη «Empty tubes for sample collection» με 5 κενά φιαλίδια
6. 1 σακουλάκι με ένδειξη «Nanoplasmas detectionchip» με το chip ανίχνευσης
7. 5 φιαλίδια με «Solution A»
8. 5 φιαλίδια με «Solution B»
9. 1 σακουλάκι με ένδειξη «Solution B2»
10. 1 σακουλάκι με ένδειξη «Regeneration mixture B2»
11. Στρογγυλά αυτοκόλλητα σφράγισης

Απαιτούμενος εξοπλισμός

- Nanoplasmas Analyzer για Real-time LAMP και ποσοτικοποίηση ή Θερμαντική πλάκα (hotplate) ρυθμισμένη στους 66 ± 1°C (μόνο για screening)
- Πιπέτα εύρους 10–100μl και αντίστοιχα αποστειρωμένα tips με φίλτρο.

Ορθές πρακτικές χειρισμού

- Πριν από τη χρήση του kit, καθαρίστε τον χώρο εργασίας με αντισηπτικό (π.χ. αλκοόλη, αιθανόλη) και αποφύγετε την ομιλία/την διασπορά σταγονιδίων αναπνοής τόσο πάνω από το chip όσο και κατά την προετοιμασία των διαλυμάτων.
- Χειριστείτε το kit με καινούργια καθαρά γάντια.
- Ακολουθείστε με ακρίβεια τις οδηγίες και τη διάρκεια κάθε βήματος του πρωτοκόλλου.

Οδηγίες

Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τρεις φάσεις:

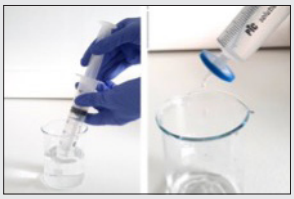
1. Προετοιμασία δείγματος
2. Δέσμευση των βακτηρίων, λύση, ενίσχυση του DNA και ανίχνευση στο chip
3. Ανάγνωση και εξαγωγή αποτελεσμάτων

Το kit περιέχει και στις δύο εκδόσεις (L1 και L5) όλα τα απαραίτητα υλικά για την προετοιμασία του δείγματος (Επιλογή Α, Στάδιο 1). Εναλλακτικά, μπορεί να ακολουθηθεί η εργαστηριακή διαδικασία (ISO 11731:2017) με χρήση συστήματος κενού (Επιλογή Β, Στάδιο 1).

Στάδιο 1: Προετοιμασία δείγματος

Επιλογή Α: **Πρωτόκολλο προετοιμασίας του δείγματος στο πεδίο**

Βήμα Α.1: Γεμίστε τη σύριγγα των 50ml (1) με το δείγμα νερού, προσαρμόστε το φίλτρο (4) και φιλτράρετε (εικόνα 1). Βγάλτε το φίλτρο (τοποθετείστε το στην συσκευασία του) και επαναλάβετε το βήμα άλλες τρεις φορές με το ίδιο φίλτρο, ώστε να φιλτραριστούν συνολικά 200ml δείγματος. Μην απορρίψετε το φίλτρο.



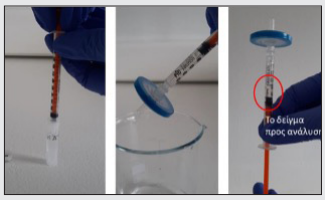
Εικόνα 1: Απεικόνιση του βήματος Α.1

nanoplasmas
Nanotechnology in microfluidics

ΤΕΠΑ ΛΕΥΚΙΠΠΟΣ, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ
Πατρ. Γρηγορίου & Νεαπόλεως 27,
15341 Αγ Παρασκευή, ΑΤΤΙΚΗ

Email: contact@nanoplasmas.com
www.nanoplasmas.com

Βήμα Α.2: Με την σύριγγα του 1ml (3), πάρτε 0,5ml από το φιαλίδιο με ένδειξη «Solution A» (7). Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχουν καθόλου φυσαλίδες αέρα. Προσαρμόζετε το φίλτρο (4) του προηγούμενου βήματος και εισάγετε το διάλυμα. Κατόπιν, τοποθετείστε την σύριγγα με το φίλτρο κατακόρυφα και μετακινείστε γρήγορα το έμβολο πάνω-κάτω 10 φορές. Έπειτα, τραβήξτε το έμβολο προς τα κάτω για να ανακτήσετε το δείγμα προς ανάλυση (όγκος ~200μl) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Απεικόνιση του βήματος Α.2

Βήμα Α.3: Ενώ εξακολουθείτε να κρατάτε το έμβολο της σύριγγας προς τα κάτω, αφαιρέστε το φίλτρο και απορρίψτε το. Μεταφέρετε το διάλυμα που συλλέχθηκε από την σύριγγα στο κενό φιαλίδιο που παρέχεται στο σακουλάκι με ένδειξη «Empty tubes for sample collection» (5). Η ποσότητα που ανακτήσατε είναι το προς ανάλυση δείγμα που θα χρησιμοποιήσετε στα επόμενα βήματα.

Επιλογή Β: **Εργαστηριακό πρωτόκολλο προετοιμασίας του δείγματος (ISO 11731:2017)**

Βήμα Β.1: Φιλτράρετε υπό κενό τα 200ml του υδάτινου δείγματος.

Βήμα Β.2: Συλλέξτε 10ml από τον τελικό όγκο του Βήματος Β.1 χρησιμοποιώντας τη σύριγγα των 10ml (2). Έπειτα, προσαρμόστε τη σύριγγα στο φίλτρο (4) και πιέστε ώστε ολόκληρο το περιεχόμενό της να περάσει μέσα από το φίλτρο. Μην απορρίψετε το φίλτρο.

Βήμα Β.3: Με την σύριγγα του 1ml (3), πάρτε 0,5ml από το φιαλίδιο με ένδειξη «Solution A» (7). Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχουν καθόλου φυσαλίδες αέρα. Προσαρμόζετε το φίλτρο (4) στη σύριγγα του προηγούμενου βήματος και εισάγετε το διάλυμα. Αφού φιλτραριστεί όλο το περιεχόμενο της σύριγγας, τοποθετείστε την κατακόρυφα με το φίλτρο στο επάνω μέρος και μετακινείστε το έμβολο πάνω-κάτω 10 φορές. Έπειτα, τραβήξτε το έμβολο προς τα κάτω για να ανακτήσετε το δείγμα προς ανάλυση (όγκος ~200μl) (Εικόνα 2).

Βήμα Β.4: Ενώ εξακολουθείτε να κρατάτε το έμβολο της σύριγγας προς τα κάτω, αφαιρέστε το φίλτρο και απορρίψτε το. Μεταφέρετε το διάλυμα που συλλέχθηκε από την σύριγγα στο κενό φιαλίδιο που παρέχεται στο σακουλάκι με ένδειξη «Empty tubes for sample collection» (5). Η ποσότητα που ανακτήσατε είναι το προς ανάλυση δείγμα που θα χρησιμοποιήσετε στα επόμενα βήματα.

Στάδιο 2: Δέσμευση των βακτηρίων, λύση, ενίσχυση του DNA και ανίχνευση στο chip

Ορθές πρακτικές χειρισμού

- Βεβαιωθείτε ότι το tip εφαρμόζει ακριβώς στην οπή εισαγωγής του εκάστοτε καναλιού του chip.
- Οι εγχύσεις πρέπει να πραγματοποιούνται με ελεγχόμενο τρόπο. (Σημείωση: οι πιπέτες διαθέτουν συνήθως δύο θέσεις έγχυσης, η πρώτη χρησιμοποιείται για την αναρρόφηση - έγχυση του επιθυμητού όγκου διαλύματος, ενώ η δεύτερη μόνο για την αποβολή τυχόν πλεονάζοντος όγκου και δεν πρέπει να χρησιμοποιείται κατά την διεξαγωγή του πρωτοκόλλου ανάλυσης). Σε όλα τα βήματα του πρωτοκόλλου πρέπει να γίνεται χρήση μόνο της πρώτης θέσης έγχυσης.
- Όταν αφαιρείτε την πιπέτα από την οπή του καναλιού πρέπει να διατηρείτε το έμβολο πατημένο και να το ελευθερώνετε μόνο όταν το tip έχει βγεί από την οπή (εάν απελευθερώσετε το έμβολο ενώ το tip παραμένει στην οπή, δημιουργείται αλλαγή της πίεσης που μπορεί να προκαλέσει επιμόλυνση).
- Να αλλάζετε το tip της πιπέτας σε κάθε έγχυση υγρού ή αέρα στα κανάλι του chip (ακόμη και όταν πρόκειται για δεύτερη συνεχόμενη έγχυση αέρα στο ίδιο βήμα).
- Μην χρησιμοποιείτε ποτέ το ίδιο tip για τα κανάλια ελέγχου και ανίχνευσης.
- Όπου ζητείται, βεβαιωθείτε ότι το κανάλι έχει στεγνωθεί επαρκώς.
- Όπου ζητείται, τοποθετήστε τα αυτοκόλλητα στις οπές με ακρίβεια.

Για την εκδοχή L1 (ανάλυση ενός δείγματος)

Βήμα 2.1: Με την πιπέτα αναρροφήστε 100μl από το φιαλίδιο με ένδειξη «Solution B» (8). Αφού τοποθετήσετε το tip στην οπή εισόδου του καναλιού ελέγχου (control channel), ωθήστε αργά (μέχρι το πρώτο στοπ της πιπέτας) όλο τον όγκο μέσα στο κανάλι ώστε να παραμένει γεμάτο. Απορρίψτε το tip.

Βήμα 2.2: Αναρροφήστε με την πιπέτα 100μl από το φιαλίδιο με την ένδειξη «Solution B» και, αφού τοποθετήσετε το tip στην οπή εισόδου του καναλιού ανίχνευσης (detection channel), ωθείστε το διάλυμα μέσα στο κανάλι (πάνω κάτω-πατήστε σταδιακά το έμβολο της πιπέτας μέχρι να γεμίσει το κανάλι και στη συνέχεια αφήστε το έμβολο να επανέλθει αργά ώστε να επιστρέψει το διάλυμα μέσα στο tip, επαναλάβετε τη διαδικασία 8–10 φορές). Τέλος, σπρώξτε στο κανάλι τυχόν περίσσεια διαλύματος και απορρίψτε το tip. Επαναλάβετε αυτό το βήμα με άλλα 100μl από το Solution B.

Βήμα 2.3: Τοποθετείστε καθαρό tip και ωθείστε αέρα μέσα στο κανάλι ανίχνευσης (detection channel) για να το στεγνώσετε πλήρως (να μην υπάρχει ορατό υγρό εντός του).

Σημαντικό: Το αποτελεσματικό στέγνωμα των καναλιών είναι απαραίτητο για την αποφυγή επιμόλυνσης και παρεμβολών μεταξύ καναλιών (cross-talking). Αν δεν τηρηθεί, μπορεί να οδηγήσει σε άκυρο ή καθόλου αποτέλεσμα).

ΤΕΠΑ ΛΕΥΚΙΠΠΟΣ, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ
Πατρ. Γρηγορίου & Νεαπόλεως 27,
15341 Αγ Παρασκευή, ΑΤΤΙΚΗ
Email: contact@nanoplasmas.com
www.nanoplasmas.com

Βήμα 2.4: Με την πιπέτα, εισάγετε 25μl από το δείγμα προς ανάλυση (Βήμα Α.3 αν ακολουθήθηκε η επιλογή Α, βήμα Β.4 αν ακολουθήθηκε η επιλογή Β) στο κανάλι ανίχνευσης (detection channel) και αφήστε το στο κανάλι για 25 λεπτά. Επαναλάβετε αυτό το βήμα άλλες τρεις φορές. Μετά από κάθε εισαγωγή δείγματος, χρησιμοποιείστε καινούργιο tip. Εάν δεν γίνει η αλλαγή των tips, μπορεί να προκύψει άκυρο ή καθόλου αποτέλεσμα.

Σημείωση: Για γρήγορη οπτική ανίχνευση, εκτίμηση κινδύνου ή ταχύ ημιποσοτικό έλεγχο υδάτινου δείγματος, επαρκούν και δύο επαναλήψεις του βήματος. Για την προτεινόμενη ανάλυση προς εξαγωγή της ακριβούς συγκέντρωσης από τον Nanoplasmas Analyzer, απαιτούνται τέσσερις επαναλήψεις.

Βήμα 2.5: Με την πιπέτα αναρροφήστε 12μl από το φιαλίδιο με ένδειξη «Reg. mix B1», προσθέστε τα στο φιαλίδιο με ένδειξη «Solution B1» και αναδεύστε ήπια πάνω κάτω 7–8 φορές μέχρι το διάλυμα να αποκτήσει ομοιόμορφο ροζ χρώμα. Παρομοίως, με την πιπέτα αναρροφήστε 24μl από το φιαλίδιο με ένδειξη «Reg.mix B2», προσθέστε τα στο φιαλίδιο με ένδειξη «Solution B2» και αναδεύστε ήπια πάνω κάτω 7–8 φορές μέχρι να αποκτήσει ομοιόμορφο ροζ χρώμα.

Προσοχή: Μετά την ανάμιξη των «Reg. mix B1» και «Reg. mix B2» με τα «Solution B1» και «Solution B2» αντίστοιχα, τα διαλύματα πρέπει να έχουν ροζ χρώμα. Εάν κάποιο από αυτά εμφανίζει πορτοκαλί ή κίτρινη απόχρωση, δεν είναι κατάλληλο για χρήση και πρέπει να απορριφθεί.

Βήμα 2.6: Στεγνώστε το κανάλι ελέγχου (control channel) εισάγοντας αέρα με την πιπέτα. Έπειτα, εισάγετε 12μl από το περιεχόμενο του φιαλιδίου «Solution B1» στο κανάλι ελέγχου (control channel) και σφραγίστε την οπή εισόδου με το στρογγυλό αυτοκόλλητο σφράγισης (10) που περιέχεται στο kit.

Προσοχή: Βεβαιωθείτε ότι τα αυτοκόλλητα έχουν τοποθετηθεί σωστά στις οπές στα βήματα που απαιτείται, ώστε να αποτραπεί η είσοδος αέρα στη συνέχεια.

Βήμα 2.7: Με καινούργιο tip, εισάγετε 30μl από το φιαλίδιο με ένδειξη «Solution B» στο κανάλι ανίχνευσης (detection channel) για πλύση. Απορρίψτε το tip.

Βήμα 2.8: Στεγνώστε το κανάλι ανίχνευσης (detection channel) εισάγοντας αέρα με την πιπέτα. Στη συνέχεια, εισάγετε 24μl από το περιεχόμενο του φιαλιδίου «Solution B2» στο κανάλι ανίχνευσης (detection channel) και σφραγίστε την οπή εισόδου με το στρογγυλό αυτοκόλλητο σφράγισης (10).

Βήμα 2.9:

Επιλογή Α (συνιστάται): Ενεργοποιήστε τον Nanoplasmas Analyzer πατώντας το μαύρο κουμπί στο πίσω μέρος και ακολουθήστε τις οδηγίες για το Στάδιο 3 «Ανάγνωση και εξαγωγή αποτελεσμάτων, Επιλογή Α».

Επιλογή Β: Τοποθετήστε το chip σε θερμαντική πλάκα (hotplate) ρυθμισμένη στους 66°C για 60 λεπτά. Για την εξαγωγή του αποτελέσματος, ακολουθήστε τις οδηγίες για το Στάδιο 3 «Ανάγνωση και εξαγωγή αποτελεσμάτων, Επιλογή Β».

Για την εκδοχή L5 (ανάλυση πέντε δειγμάτων)

Για το κιτ ταυτόχρονης ανάλυσης 5 υδάτινων δειγμάτων (L5), ακολουθήστε τα βήματα 2.2 έως 2.4 για κάθε κανάλι ανίχνευσης (test channels 1-5).

Βήμα 2.1: Με την πιπέτα αναρροφήστε 100μl από το φιαλίδιο με ένδειξη «Solution B» (8). Αφού τοποθετήσετε το tip στην οπή εισόδου του καναλιού ελέγχου (control channel), προωθήστε αργά (μέχρι το πρώτο στοπ της πιπέτας) όλο τον όγκο μέσα στο κανάλι ώστε να παραμένει γεμάτο. Απορρίψτε το tip.

Βήμα 2.2: Αναρροφήστε με την πιπέτα 100μl από το φιαλίδιο με την ένδειξη «Solution B» και, αφού τοποθετήσετε το tip στην οπή εισόδου του καναλιού ανίχνευσης (detection channel), ωθείστε το διάλυμα μέσα στο κανάλι (πάνω κάτω - πατήστε σταδιακά το έμβολο της πιπέτας μέχρι να γεμίσει το κανάλι και στη συνέχεια αφήστε το έμβολο να επανέλθει αργά ώστε να επιστρέψει το διάλυμα μέσα στο tip, επαναλάβετε τη διαδικασία 8–10 φορές). Τέλος, σπρώξτε στο κανάλι τυχόν περίσσεια διαλύματος και απορρίψτε το tip. Επαναλάβετε αυτό το βήμα με άλλα 100μl από το Solution B.

Βήμα 2.3: Τοποθετείστε καθαρό tip και ωθείστε αέρα μέσα στο κανάλι ανίχνευσης (detection channel) για να το στεγνώσετε πλήρως (να μην υπάρχει ορατό υγρό εντός του).

(Σημαντικό: Το αποτελεσματικό στέγνωμα των καναλιών είναι απαραίτητο για την αποφυγή επιμόλυνσης και παρεμβολών μεταξύ καναλιών (cross-talking). Αν δεν τηρηθεί, μπορεί να οδηγήσει σε άκυρο ή καθόλου αποτέλεσμα).

Βήμα 2.4: Με την πιπέτα, εγχύστε 25μl από το δείγμα προς ανάλυση (Βήμα Α.3 αν ακολουθήθηκε η επιλογή Α από το Στάδιο 1, βήμα Β.4 αν ακολουθήθηκε η επιλογή Β από το Στάδιο 1) και αφήστε το στο κανάλι για 25 λεπτά. Επαναλάβετε αυτό το βήμα άλλες τρεις φορές. Μετά από κάθε εισαγωγή δείγματος, χρησιμοποιείστε καινούργιο tip. Εάν δεν γίνει η αλλαγή των tips, μπορεί να προκύψει άκυρο ή καθόλου αποτέλεσμα.

Σημείωση: Για γρήγορη οπτική ανίχνευση, εκτίμηση κινδύνου ή ταχύ ημιποσοτικό έλεγχο υδάτινου δείγματος, επαρκούν και δύο επαναλήψεις του βήματος. Για την προτεινόμενη ανάλυση προς εξαγωγή της ακριβούς συγκέντρωσης από τον Nanoplasmas Analyzer, απαιτούνται τέσσερις επαναλήψεις.

Βήμα 2.5: Με την πιπέτα αναρροφήστε 24μl από το φιαλίδιο με ένδειξη «Regeneration mixture B2» και προσθέστε τα στα 6 φιαλίδια με ένδειξη «Solution B2» (ένα θα χρησιμοποιηθεί για το κανάλι ελέγχου (control channel) και τα υπόλοιπα για καθένα από τα 5 κανάλια ανίχνευσης (test 1-5)). Ήπια ανάδευση πάνω κάτω 7–8 φορές μέχρι το διάλυμα να αποκτήσει ομοιόμορφο ροζ χρώμα.

Προσοχή: Μετά την ανάμιξη του «Regeneration mixture B2» με το «Solution B2», τα διαλύματα πρέπει να έχουν ροζ χρώμα. Εάν κάποιο από αυτά εμφανίζει πορτοκαλί ή κίτρινη απόχρωση, δεν είναι κατάλληλο για χρήση και πρέπει να απορριφθεί.

Βήμα 2.6: Στεγνώστε το κανάλι ελέγχου (control channel) εισάγοντας αέρα με την πιπέτα. Έπειτα, εγχύστε 12μl από το περιεχόμενο του φιαλιδίου «Solution B2» στο κανάλι ελέγχου (control channel) και σφραγίστε την οπή εισόδου με το στρογγυλό αυτοκόλλητο σφράγισης (10) που περιέχεται στο kit.

Προσοχή: Βεβαιωθείτε ότι τα αυτοκόλλητα έχουν τοποθετηθεί σωστά στις οπές στα βήματα που απαιτείται, ώστε να αποτραπεί η είσοδος αέρα στη συνέχεια.

ΤΕΠΑ ΛΕΥΚΙΠΠΟΣ, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ
Πατρ. Γρηγορίου & Νεαπόλεως 27,
15341 Αγ Παρασκευή, ΑΤΤΙΚΗ
Email: contact@nanoplasmas.com
www.nanoplasmas.com

Βήμα 2.7: Με την πιπέτα εισάγετε 30μl από το φιαλίδιο με ένδειξη «Solution B» σε καθένα από τα 5 κανάλια ανίχνευσης (test 1-5) για πλύση. Χρησιμοποιείστε καινούργιο tip για κάθε κανάλι και απορρίψτε το μετά την χρήση.

Βήμα 2.8: Στεγνώστε κάθε κανάλι ανίχνευσης (test 1-5) εισάγοντας αέρα με την πιπέτα (χρησιμοποιείστε διαφορετικό tip για κάθε κανάλι). Στη συνέχεια, εγχύστε 24μl «Solution B2» σε καθένα από τα 5 κανάλια ανίχνευσης (test 1-5) και σφραγίστε όλες τις οπές εισόδου με το στρογγυλό αυτοκόλλητο σφράγισης (10).

Βήμα 2.9:

Επιλογή Α (συνιστάται): Ενεργοποιήστε τον Nanoplasmas Analyser πατώντας το μαύρο κουμπί στο πίσω μέρος και ακολουθήστε τις οδηγίες για το Στάδιο 3 «Ανάγνωση και εξαγωγή αποτελεσμάτων, Επιλογή Α».

Επιλογή Β: Τοποθετήστε το chip σε θερμαντική πλάκα (hotplate) ρυθμισμένη στους 66°C για 60 λεπτά. Για την εξαγωγή του αποτελέσματος, ακολουθήστε τις οδηγίες για το Στάδιο 3 «Ανάγνωση και εξαγωγή αποτελεσμάτων, Επιλογή Β».

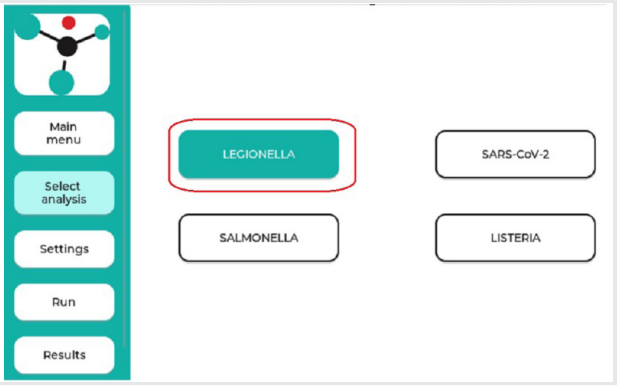
Στάδιο 3. Ανάγνωση και εξαγωγή αποτελεσμάτων

Ορθές πρακτικές χειρισμού

Επιλογή Α (συνιστάται): Για ακριβή ποσοτική ανίχνευση με τον Nanoplasmas Analyzer (ευαισθησία έως και 10 CFU/L) ακολουθείστε τα παρακάτω βήματα. Ο αναλυτής έχει δυναμικό εύρος λειτουργίας 10-20000 CFU/L

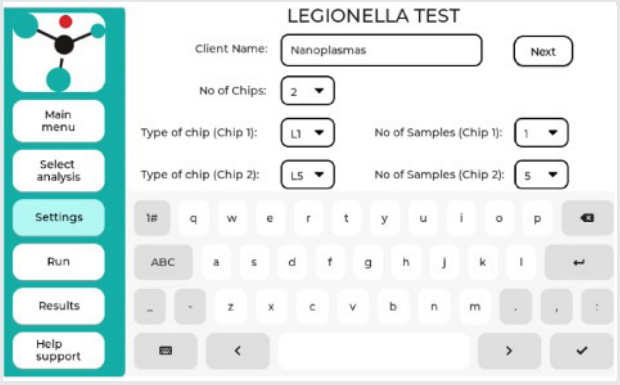
Εικόνα 3.1

1. Πιέστε ***Select analysis*** όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1.



Εικόνα 3.2

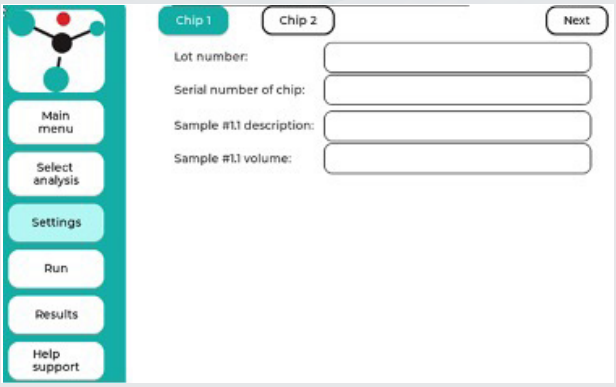
2. Επιλέξτε τον τύπο του βακτηρίου ή του ιού που θέλετε να ανιχνεύσετε στο δείγμα, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2.



Εικόνα 3.3

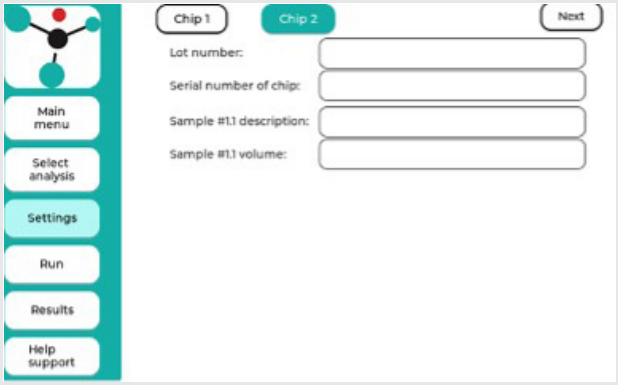
3. Το προηγούμενο βήμα θα σας οδηγήσει στο μενού ρυθμίσεων. Εισαγάγετε το ***Client name***, επιλέξτε τον αριθμό των Chips (1 ή 2), τον τύπο του chip (L1, L5) καθώς και τον αριθμό των δειγμάτων στο Chip 1 και τον αριθμό των δειγμάτων στο Chip 2, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.3, και πατήστε ***Next***.

ΤΕΠΑ ΛΕΥΚΙΠΠΟΣ, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ
Πατρ. Γρηγορίου & Νεαπόλεως 27,
15341 Αγ Παρασκευή, ΑΤΤΙΚΗ
Email: contact@nanoplasmas.com
www.nanoplasmas.com



Εικόνα 3.4

4. Επιλέξτε το ***Chip 1*** και εισαγάγετε το ***Lot number*** του kit, την ***Sample description*** (περιγραφή του δείγματος), τον ***Serial no of chip*** (σειριακό αριθμό του chip) και τον αρχικό όγκο που φιλτράρατε (π.χ. 200ml), για όλα τα δείγματα στο Chip 1 (Εικόνα 3.4).

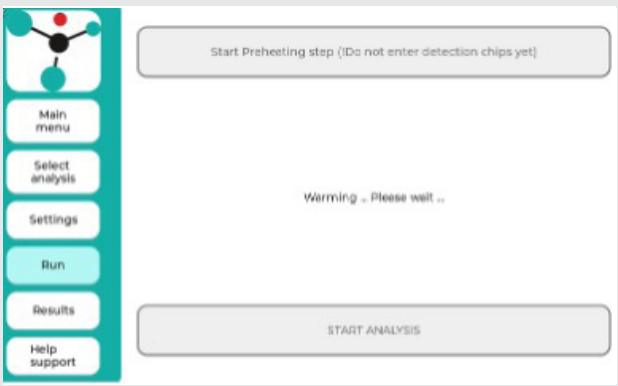


Εικόνα 3.5

5. Στη συνέχεια, επιλέξτε το ***Chip 2*** και εισαγάγετε το ***Lot number*** του kit, την ***Sample description*** (περιγραφή του δείγματος), τον ***Serial no of chip*** (σειριακό αριθμό του chip) και τον αρχικό όγκο που φιλτράρατε (π.χ. 200 ml), για όλα τα δείγματα στο Chip 2 (Εικόνα 3.5). Όταν συμπληρωθούν όλα τα πεδία, επιλέξτε ***Next***.

Εικόνα 3.6

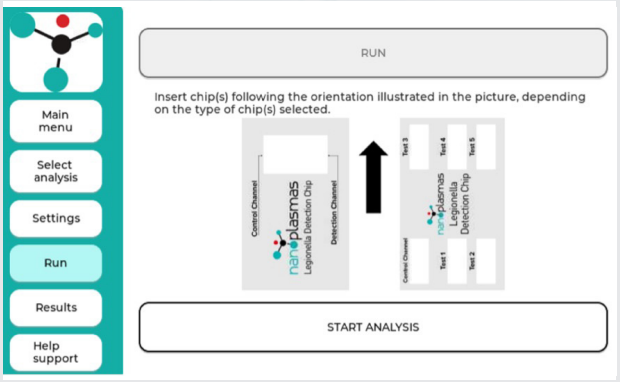
6. Πατήστε ***Start Preheating step*** (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.7

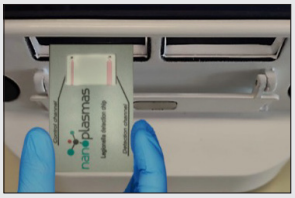
7. Περιμένετε να εμφανιστεί η ένδειξη ***Warming... Please wait...*** Μην εισάγετε τα chips ακόμα (Εικόνα 3.7)!

ΤΕΠΑ ΛΕΥΚΙΠΠΟΣ, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ
Πατρ. Γρηγορίου & Νεαπόλεως 27,
15341 Αγ Παρασκευή, ΑΤΤΙΚΗ
Email: contact@nanoplasmas.com
www.nanoplasmas.com

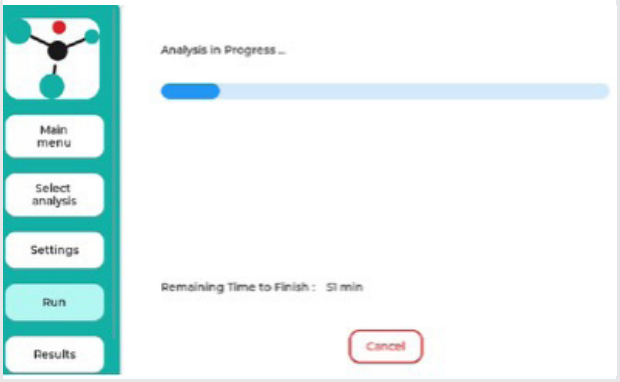


Εικόνα 3.8.1

8. Μόλις εμφανιστούν οι πληροφορίες της Εικόνας 3.8.1, τοποθετήστε τα chips στον Nanoplasmas Analyzer όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.8.2 και επιλέξτε ***Start Analysis***.

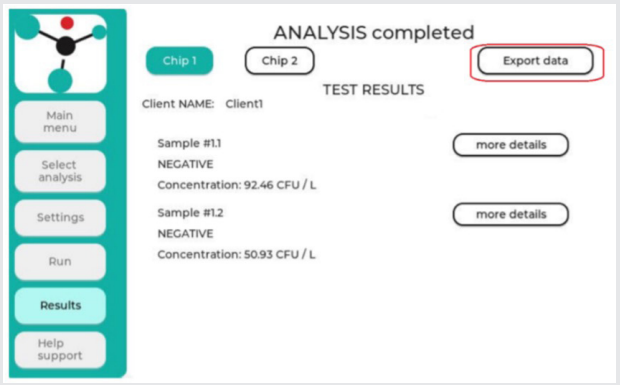


Εικόνα 3.8.2



Εικόνα 3.9

9. Μετά την επιλογή του ***Start Analysis***, θα εμφανιστεί στην οθόνη η Εικόνα 3.9, που δείχνει την πρόοδο της ανάλυσης.



Εικόνα 3.10

10. Μόλις ολοκληρωθεί η ανάλυση, θα εμφανιστεί στην οθόνη η Εικόνα 3.10, όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης για κάθε δείγμα στα Chip 1 και Chip 2. Για την εξαγωγή των δεδομένων, επιλέξτε ***Export data***.

Πιθανά αποτελέσματα της ανάλυσης

POSITIVE: Σύμφωνα με το όριο της νομοθεσίας >1000CFU/L ταυτόχρονα εμφανίζεται και η ακριβής τιμή της συγκέντρωσης.

NEGATIVE: Σύμφωνα με το όριο της νομοθεσίας <1000CFU/L ταυτόχρονα εμφανίζεται και η ακριβής τιμή της συγκέντρωσης.

INVALID: Το κανάλι ελέγχου έχει επιμολυνθεί. *Η ανάλυση δεν είναι αξιόπιστη και πρέπει να επαναληφθεί με νέο kit*

UNDEFINED: η ανάλυση απέτυχε λόγω μη αναμενόμενης συμπεριφοράς του δείγματος. *Η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί με νέο kit*

Εικόνα 3.11

11. Μετά την επιλογή του ***Export data***, θα εμφανιστεί στην οθόνη η Εικόνα 3.11. Εισάγετε το USB stick και επιλέξτε ***DATA SAVED TO USB***.

ΤΕΠΑ ΛΕΥΚΙΠΠΟΣ, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ
Πατρ. Γρηγορίου & Νεαπόλεως 27,
15341 Αγ Παρασκευή, ΑΤΤΙΚΗ
Email: contact@nanoplasmas.com
www.nanoplasmas.com

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΚΙΤ **ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ** ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ***LEGIONELLA PNEUMOPHILA***

Η παρούσα δοκιμή αποτελεί ακριβή μοριακή διάγνωση και απαιτεί προσεκτικό χειρισμό των αντιδραστηρίων ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιμόλυνση. Το προϊόν αυτό προορίζεται για την ταχεία διάγνωση των βακτηρίων Legionella pneumophila. Δεν υποκαθιστά τους περιοδικούς ελέγχους που απαιτούνται από τη νομοθεσία, εκτός εάν έχει πιστοποιηθεί ως μέθοδος από διαπιστευμένο εργαστήριο.

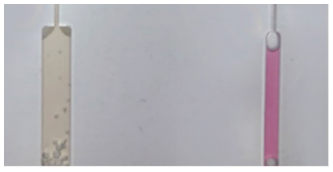
Επιλογή Β: **Για γρήγορη οπτική ανίχνευση, εκτίμηση κινδύνου δείγματος νερού:** Μετά την περίοδο θέρμανσης των 60 λεπτών, αφαιρέστε το chip από την θερμαντική πλάκα (hotplate) και πραγματοποιήστε οπτική ανίχνευση των αποτελεσμάτων, ακολουθώντας τους χρωματικούς κώδικες του παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1). Στον Πίνακα 2 παρέχονται εικόνες άκυρων τεστ. Εάν το κανάλι ελέγχου, μετά τη θέρμανση, γίνει μερικώς ή πλήρως κίτρινο/πορτοκαλί ή αδειάσει, το τεστ θεωρείται άκυρο και θα πρέπει να επαναληφθεί με νέο kit.

Σημαντική σημείωση: Η επιλογή αυτή παρέχεται μόνο για επείγοντα έλεγχο για σκοπούς διαχείρισης κινδύνου, ελλείψει του Αναλυτή Nanoplasmas. Συνιστάται γενικά να ακολουθείται η επιλογή Α, η οποία παρέχει ακριβή, ποσοτικά αποτελέσματα.

Πίνακας 1: Χρωματικός κώδικας για τον ημιποσοτικό έλεγχο (screening) της παρουσίας της L. pneumophila στο δείγμα νερού. Ενδεικτικές εικόνες των καναλιών μετά από 4 εγχύσεις των 25μl, επώαση 25 λεπτών σε κάθε βήμα και συνολικό χρόνο αντίδρασης 60 λεπτών στους 66 °C. Σε κάθε εικόνα: Detection channel (αριστερά), control channel (δεξιά).

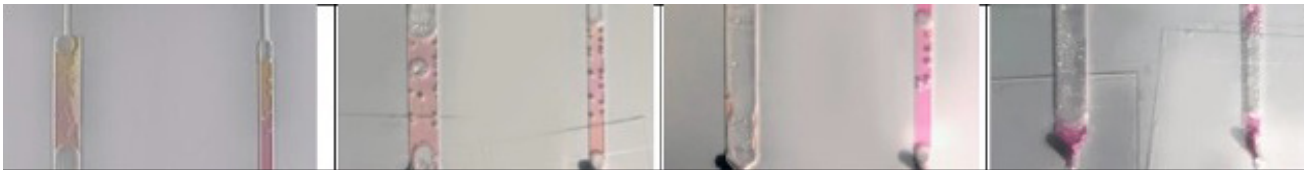
Συγκέντρωση: 0-99 CFU/L

Συγκέντρωση ≥100 CFU/L



Invalid tests Ένα τεστ θεωρείται άκυρο εάν ολόκληρο το κανάλι ελέγχου (control channel) ή μέρος αυτού γίνει κίτρινο, ή αν το κανάλι εμφανιστεί κενό (κάτι που συμβαίνει συχνά όταν τα παρεχόμενα αυτοκόλλητα σφράγισης δεν έχουν τοποθετηθεί σωστά πριν από το στάδιο θέρμανσης)

Πίνακας 2: Εικόνες άκυρων (invalid) τεστ. Σε κάθε εικόνα: Detection channel (αριστερά), control channel (δεξιά).



nanoplasmas
Nanotechnology in microfluidics

ΤΕΠΑ ΛΕΥΚΙΠΠΟΣ, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ
Πατρ. Γρηγορίου & Νεαπόλεως 27,
15341 Αγ Παρασκευή, ΑΤΤΙΚΗ

Email: contact@nanoplasmas.com
www.nanoplasmas.com