

MANUALE TECNICO

Maxwell® CSC Blood DNA Kit

Istruzioni per l'uso del prodotto

AS1321

Attenzione: maneggiare le cartucce con attenzione; i bordi del sigillo possono essere taglienti.

Maxwell® CSC Blood DNA Kit

Tutta la letteratura tecnica è disponibile via Internet all'indirizzo: www.promega.com/protocols/
 Visitare il sito web per verificare che la versione in uso del presente manuale tecnico sia quella più aggiornata.
 In caso di domande sull'utilizzo del sistema, contattare i Promega Technical Services all'indirizzo e-mail: techserv@promega.com

1. Descrizione	2
2. Componenti del prodotto, condizioni di conservazione e legenda dei simboli	3
3. Finalità prevista/uso previsto del prodotto.....	5
4. Limitazioni all'utilizzo del prodotto	5
5. Prima di iniziare	6
5.A. Preparazione dei campioni di sangue intero	6
5.B. Preparazione della Maxwell® CSC Blood DNA Cartridge	7
6. Corsa dello strumento	9
7. Post-purificazione	11
8. Valutazione delle prestazioni analitiche	11
8.A. Quantità, qualità e amplificabilità del DNA	11
8.B. Riproducibilità	14
8.C. Sostanze interferenti (inibizione).....	15
8.D. Contaminazione crociata	15
9. Valutazione delle prestazioni cliniche	16
9.A. Amplificabilità del DNA	16
9.B. Riproducibilità	17
9.C. Contaminazione crociata	17
10. Risoluzione dei problemi	18
11. Bibliografia.....	19
12. Prodotti correlati	19
13. Riepilogo delle modifiche.....	19

Maxwell® CSC Blood DNA Kit è disponibile solo in alcuni paesi.

1. Descrizione

Il Maxwell® CSC Blood DNA Kit^(a,b) viene usato in combinazione con i Maxwell® Instrument specificati nella Tabella 1 per fornire un metodo semplice per la purificazione efficiente e automatica del DNA genomico (gDNA) da campioni di sangue umano. I Maxwell® CSC Instrument sono progettati per essere utilizzati con le cartucce di reagenti predosati e con reagenti aggiuntivi forniti nel kit con metodi di purificazione preprogrammati, massimizzando la semplicità e la facilità d'uso. I Maxwell® CSC Instrument possono processare da uno al numero massimo di campioni consentito in circa 40 minuti; il DNA purificato può essere usato direttamente in applicazioni a valle come PCR.

Tabella 1. Strumenti supportati.

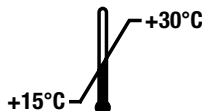
Strumento	Cat. #	Manuale tecnico
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Principio del metodo: Maxwell® CSC Blood DNA Kit purifica l'acido nucleico utilizzando particelle paramagnetiche, che forniscono una fase solida mobile per ottimizzare la cattura dei campioni, il lavaggio e la purificazione del gDNA. I Maxwell® CSC Instrument sono strumenti per la gestione di particelle magnetiche che creano un legame efficiente del gDNA alle particelle paramagnetiche nella prima camera di una cartuccia preriempita e spostano il campione attraverso le camere della cartuccia. Questo approccio alla cattura magnetica evita problemi frequenti quali puntali coagulati o trasferimenti di reagente parziali, che con altri sistemi automatizzati comunemente usati portano ad un'elaborazione della purificazione non ottimale.

2. Componenti del prodotto, condizioni di conservazione e legenda dei simboli

PRODOTTO	QUANTITÀ	CAT.#
Maxwell® CSC Blood DNA Kit	48 prep	AS1321


Per uso diagnostico in vitro. Esclusivamente ad uso professionale. Sufficiente per 48 isolamenti automatici da 300 µl di campioni di sangue intero. Le cartucce Maxwell® CSC Cartridge sono esclusivamente mono-uso.





Include:

- 2 × 1 ml Soluzione Proteinasi K (PK)
- 20 ml Tampone di lisi
- 48 Maxwell® CSC Blood Cartridges
- 50 Stantuffi CSC/RSC
- 50 Provette di eluizione (0,5 ml)
- 20 ml Tampone di eluizione

Condizioni di conservazione: conservare Maxwell® CSC Blood DNA Kit tra +15 e +30°C.

 **Informazioni sulla sicurezza:** le cartucce di contengono etanolo e isopropanolo. Queste sostanze devono essere considerate infiammabili, pericolose e irritanti. Il tampone di lisi contiene guanidina idrocloruro e urea. Queste sostanze devono essere considerate tossiche, pericolose ed irritanti. Per informazioni dettagliate sulla sicurezza, consultare l'SDS.



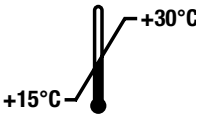











 I componenti di Maxwell® CSC Blood DNA Kit sono progettati per essere utilizzati con sostanze potenzialmente infettive. Indossare dispositivi di protezione individuale (p. es., guanti e occhiali sicurezza) durante la manipolazione di sostanze infettive. Attenersi alle linee guida della propria struttura per la gestione e lo smaltimento di tutte le sostanze infettive utilizzate con questo sistema.

 **Attenzione:** maneggiare le cartucce con attenzione; i bordi del sigillo possono essere taglienti.

Informazioni aggiuntive: i componenti del Maxwell® CSC Blood DNA Kit sono qualificati e comprovati per funzionare insieme. Non è consigliato il mescolamento dei componenti di un kit tra lotti di kit differenti. Usare solo i componenti forniti nel kit. Non utilizzare le cartucce se il sigillo sulla cartuccia non è intatto al momento della ricezione.

2. Componenti del prodotto, condizioni di conservazione e legenda dei simboli (continua)

Legenda dei simboli

Simbolo	Spiegazione	Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Rappresentante autorizzato
	Conservare tra +15 e +30°C.		Fabbricante
	Attenzione		Irritante
	Rischio per la salute.		Contenuto sufficiente per “n” test.
	Conformità alle normative europee		Avvertenza. Rischio biologico.
	Avvertenza. Pericolo di schiacciamento.		Numero catalogo
	Numero lotto		Non riutilizzare.

3. Finalità prevista/uso previsto del prodotto

Maxwell® CSC Blood DNA Kit è destinato all'uso come dispositivo medico-diagnostico in vitro (IVD) per l'isolamento automatico del DNA genomico da campioni di sangue umano intero, in combinazione con i Maxwell® CSC Instrument e il metodo di purificazione Maxwell® CSC Blood DNA. Il DNA purificato è adatto per l'impiego in analisi diagnostiche in vitro basate sull'amplificazione.

Maxwell® CSC Blood DNA Kit è previsto per un impiego ad una temperatura compresa tra 15°C e 30°C. L'impiego al di fuori di questi valori può comportare risultati non ottimali.

Con Maxwell® CSC Blood DNA Kit, possono essere utilizzati campioni di sangue intero conservati in provette contenenti EDTA, eparina o sodio citrato come anticoagulanti. La tabella di seguito mostra i tempi ammessi per la conservazione dei campioni in diverse condizioni prima dell'utilizzo nel Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Maxwell® CSC Blood DNA Kit non deve essere utilizzato con campioni prelevati con provette di altro tipo o conservati in condizioni diverse da quanto elencato di seguito.

Temperatura di conservazione del campione	Tempo di conservazione prima della purificazione
15–30°C	fino a 72 ore
2–10°C	fino a 7 giorni
–80°C o meno	illimitato

Maxwell® CSC Blood DNA Kit è destinato ad un uso esclusivamente professionale. I risultati diagnostici ottenuti utilizzando il DNA genomico purificato grazie a questo sistema devono essere interpretati congiuntamente ad altri esami clinici o di laboratorio.

4. Limitazioni all'utilizzo del prodotto

Maxwell® CSC Blood DNA Kit non deve essere utilizzato con: campioni di tessuto; campioni di fluidi corporei diversi dal sangue umano intero; campioni di sangue intero coagulato.

Maxwell® CSC Blood DNA Kit non deve essere utilizzato con campioni non umani, inclusi campioni di origine batterica e virale, o per la purificazione di RNA.

Le prestazioni di Maxwell® CSC Blood DNA Kit sono state valutate isolando il DNA da campioni di sangue intero di 50–300 µl con conta leucocitaria (wbc - white blood cell) compresa tra 4×10^6 e 10×10^6 wbc/ml.

Le prestazioni di Maxwell® CSC Blood DNA Kit sono state valutate in termini di compatibilità con i seguenti fattori potenziali di inibizione per l'amplificazione del DNA genomico: eme, alcool, IgG e guanidina. Non sono stati valutati altri composti.

L'utente è responsabile della definizione delle caratteristiche delle prestazioni necessarie per le applicazioni diagnostiche a valle. Qualsiasi applicazione diagnostica a valle che utilizzi DNA genomico purificato con Maxwell® CSC Blood DNA Kit deve includere idonei controlli.

5. Prima di iniziare

Fornitura materiali a cura dell'utente

- agitatore da banco
- pipette e puntali per il trasferimento del campione nelle cartucce preriempite di reagente
- provette da 1,5–2,0 ml per l'incubazione dei campioni (p. es., Microtubes, 1,5 ml [Cat.# V1231])
- blocco di riscaldamento a 56°C
- **opzionale:** miscelatore di provette rotante per campioni ematici liquidi

5.A. Preparazione dei campioni di sangue intero

Capacità di elaborazione dei campioni di sangue intero

La resa totale del DNA genomico proveniente da campioni di sangue intero dipende dal volume del campione e dal numero di leucociti per ml. Ogni cartuccia a corredo di Maxwell® CSC Blood DNA Kit è progettata per la purificazione di DNA genomico da 50–300 µl di sangue intero, ipotizzando un numero medio di leucociti compreso tra 4×10^6 e 10×10^6 wbc/ml di sangue intero (valori per un soggetto adulto in normali condizioni di salute, 1). Si raccomanda di eseguire una conta leucocitaria su ciascun campione prima della purificazione del DNA per verificare che il campione rientri in tale intervallo. Campioni al di fuori di questo intervallo possono fornire risultati non ottimali.

Nota: questo kit è stato testato con campioni di sangue umano intero raccolti in provette con EDTA, sodio citrato o eparina. Il buon funzionamento chimico non può essere garantito con altri tipi di provette da prelievo ematico. I campioni di sangue possono essere freschi (conservati a 15–30°C fino a 72 ore), refrigerati (conservati a 2–10°C fino a sette giorni) o congelati (conservati a –80°C o meno) prima della purificazione del DNA. I campioni congelati devono essere scongelati prima dell'elaborazione. Tutti i campioni ematici dovranno essere accuratamente mescolati prima dell'uso.

1. Mescolare tutti i campioni ematici per almeno 5 minuti a 15–30°C.
2. Preparare ed etichettare provette da incubazione che possano essere alloggiate nel blocco di riscaldamento impostato a 56°C.
3. Aggiungere 30 µl di soluzione di Proteinasi K (PK) a ciascuna provetta da incubazione.
4. Aggiungere sangue liquido (tra 50 µl e 300 µl) a ciascuna provetta da incubazione. Assicurarsi di evitare materiale coagulato (se presente) nel trasferire il sangue alla provetta da incubazione. Il sistema non deve essere utilizzato su campioni di sangue coagulato. Cambiare puntale tra ciascun trasferimento di campioni di sangue per prevenire contaminazioni crociate.
5. Aggiungere 300 µl di tampone di lisi a ciascuna provetta da incubazione. Cambiare puntale tra ciascun trasferimento di tampone di lisi per prevenire contaminazioni crociate.
6. Agitare in vortex a velocità massima per 10 secondi.
7. Incubare ciascuna provetta nel blocco di riscaldamento (impostato a 56°C) per 20 minuti. Durante questa incubazione, preparare le cartucce come descritto nella Sezione 5.B.

8. Ispezionare ciascun lisato dopo l'incubazione. A seguito del trattamento con la Proteinasi K, il campione cambia colore, passando da rosso a marrone verdastro. Se i campioni non cambiano colore dopo il trattamento con la Proteinasi K, il trattamento è stato inefficace e ciò interferirà con la resa e purezza del DNA post-purificazione. Non elaborare ulteriormente i campioni se non si osserva un cambiamento di colore dopo il periodo di incubazione con Proteinasi K.
9. Trasferire ciascun campione di sangue lisato dalla provetta da incubazione alla camera n.1 di una diversa cartuccia (la n.1 è la camera più ampia nella cartuccia). Cambiare puntale tra ciascun trasferimento di campione per prevenire contaminazioni crociate tra i campioni.

5.B. Preparazione della Maxwell® CSC Blood DNA Cartridge

1. Cambiare guanti prima di maneggiare cartucce, stantuffi CSC/RSC e provette di eluizione. Le cartucce vengono preparate nell'apposito vassoio esterno allo strumento e i vassoi che contengono le cartucce ed i campioni vengono quindi trasferiti nello strumento per la purificazione. Porre ciascuna cartuccia nel vassoio con la camera n.1 (la camera più ampia nella cartuccia) al massimo della distanza dalle provette di eluizione (Figura 2). Premere sulla cartuccia fino a quando non scatta in posizione. Assicurarsi che ambedue le estremità della cartuccia siano completamente inserite nel vassoio. Staccare delicatamente il sigillo in modo che venga completamente rimosso dalla parte superiore della cartuccia. Assicurarsi che siano stati rimossi dalla cartuccia il nastro sigillante e qualunque residuo di adesivo.



Attenzione: maneggiare le cartucce con attenzione. I bordi del sigillo possono essere taglienti.

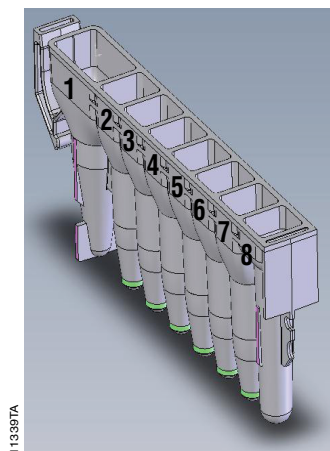
2. Posizionare uno stantuffo nella camera n.8 di ciascuna cartuccia.
3. Porre nell'apposita posizione una provetta di eluizione vuota per ciascuna cartuccia del vassoio.
Nota: usare esclusivamente le provette di eluizione a corredo di Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Altre provette di eluizione possono non essere compatibili con i Maxwell® CSC Instrument e interferire con la purificazione del DNA.
4. Aggiungere 50–100 µl di tampone di eluizione sul fondo di ciascuna provetta di eluizione.
Nota: usare esclusivamente il tampone di eluizione a corredo di Maxwell® CSC Blood DNA Kit. L'impiego di altri tamponi di eluizione può interferire con la purificazione del DNA.

Note sulla preparazione della Maxwell® CSC Blood DNA Cartridge



Eventuali fuoriuscite di campione o reagente su qualunque parte del vassoio devono essere pulite con una soluzione a base d'acqua e detergente, per applicare poi uno spray battericida, oppure strofinando e lavando nuovamente con acqua. Non usare candeggina su nessuna parte dello strumento.

5.B. Preparazione della Maxwell® CSC Blood DNA Cartridge (continua)



Componenti aggiunti dall'utente al contenuto delle camere:

1. Campione di sangue intero lisato
8. Stantuffo CSC/RSC

Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge. Il campione di sangue intero lisato viene aggiunto alla camera n.1; uno stantuffo viene aggiunto alla camera n.8.



Figura 2. Preparazione e allestimento del vassoio. Il tampone di eluizione viene aggiunto alle provette di eluizione come indicato.

6. Corsa dello strumento

Per informazioni dettagliate, consultare il manuale tecnico specifico del Maxwell® CSC Instrument in uso. Vedere la Tabella 1.

1. Accendere il Maxwell® Instrument e il tablet PC. Accedere al tablet PC e avviare il software Maxwell® IVD mode toccando due volte l'icona sul desktop. Lo strumento procederà a un'auto-verifica e tutte le parti mobili verranno portate nella posizione base.
2. Selezionare **Avvia** nella schermata iniziale.
3. Leggere o digitare il codice a barre nell'angolo in alto a destra dell'etichetta di Maxwell® CSC Blood DNA Kit e premere **OK** per selezionare automaticamente il metodo da eseguire (Figura 3).

Nota: il codice a barre del metodo di Maxwell® CSC Blood DNA Kit è necessario per la purificazione del DNA con i Maxwell® CSC Instrument. L'etichetta del kit contiene due codici a barre. Il codice a barre del metodo è indicato nella Figura 3. Se il codice a barre non è leggibile, contattare i Promega Technical Services.



Figura 3. Etichetta del kit con l'indicazione del codice a barre da leggere. Leggere il codice a barre, mostrato nel riquadro rosso sulla parte superiore destra dell'etichetta kit reagente, per avviare un ciclo di purificazione.

4. Nella schermata 'Impostazione cartuccia' toccare le posizioni della cartuccia per selezionare o deselectare le posizioni da usare per questo ciclo di estrazione. Immettere eventuali informazioni di tracciabilità campione richieste e premere il pulsante **Procedi** per continuare.

Nota: quando si usa il Maxwell® CSC 48 Instrument, premere il pulsante **Anteriore** o **Posteriore** per selezionare o deselectare le posizioni delle cartucce su ciascun vassoio.

5. Una volta aperto lo sportello, confermare che tutte le voci della lista di controllo estrazione sono state eseguite. Verificare che: i campioni pre-elaborati siano stati aggiunti alla camera n.1 delle cartucce, le cartucce siano caricate sullo strumento, le provette di eluizione stappate siano presenti con tampone di eluizione e gli stantuffi siano nella camera n.8. Trasferire il vassoio contenente le cartucce preparate sulla piattaforma del Maxwell® Instrument.

Inserimento del vassoio Maxwell®: tenere il vassoio dai lati per evitare di spostare le cartucce dal vassoio. Assicurarsi che il vassoio sia posizionato nel Maxwell® Instrument con le provette di eluizione il più vicino possibile allo sportello. Inclinare la parte posteriore del vassoio verso il basso e inserirla dentro lo strumento in modo che la parte posteriore del vassoio sia a contatto con la parte posteriore della piattaforma dello strumento. Premere la parte frontale del vassoio per fissarlo saldamente sulla piattaforma dello strumento. Se si riscontrano difficoltà nel posizionare il vassoio sulla piattaforma, verificare che il vassoio sia orientato correttamente. Accertarsi che il vassoio sia a livello con la piattaforma dello strumento e ben posizionato.

Nota: controllare l'identificativo sui vassoi Maxwell® a 24 posizioni per stabilire se devono essere posizionati nella parte anteriore o posteriore dello strumento.

6. Corsa dello strumento (continua)

6. Toccare il pulsante **Avvia** per iniziare il ciclo di estrazione. La piattaforma rientra e lo sportello si chiude.
- Nota:** quando si usa un Maxwell® Instrument a 48 posizioni, se è stato abilitato il Vision System i vassoi saranno letti quando lo sportello si ritrae. Qualsiasi errore nella configurazione dei vassoi (p. es., stantuffi non nella camera n.8, provette di eluizione non presenti e aperte) causerà il ritorno del software alla schermata “Impostazione cartuccia” e le posizioni problematiche saranno contrassegnate con un punto esclamativo racchiuso in un cerchio rosso. Toccare il punto esclamativo per visualizzare la descrizione dell’errore e risolvere tutti gli stati di errore. Toccare di nuovo il pulsante **Avvia** per ripetere la scansione del vassoio e iniziare l’estrazione.



Avvertenza: pericolo di schiacciamento.

7. Maxwell® Instrument inizierà immediatamente il ciclo di purificazione. La schermata visualizzerà i passaggi eseguiti e una stima del tempo rimanente per la fine della corsa.

Note:

1. Toccando il pulsante **Interrompi** il ciclo sarà abbandonato. Tutti i campioni di un ciclo interrotto andranno persi.
 2. Se il ciclo viene annullato prima che sia completato, potrebbe essere richiesto di controllare se gli stantuffi sono ancora caricati nell'apposita barra. Se nella barra sono presenti degli stantuffi, è necessario eseguire la **Rimozione Stantuffi** quando richiesto. Se non ci sono stantuffi nell'apposita barra, si può scegliere di saltare la **Rimozione Stantuffi** quando richiesto. I campioni andranno persi.
8. Una volta completato il ciclo, l'interfaccia utente visualizzerà un messaggio indicante che il metodo è stato completato.

Fine del ciclo

9. Seguire le istruzioni a schermo al termine del metodo per aprire lo sportello. Verificare che gli stantuffi si trovino nella camera n.8 della cartuccia al termine del ciclo. Se gli stantuffi non vengono rimossi dalla barra, seguire le istruzioni del manuale d'uso del Maxwell® Instrument in uso (vedere la Tabella 1) per eseguire un processo di **Rimozione Stantuffi** per cercare di scaricare gli stantuffi.
10. Rimuovere il vassoio dallo strumento subito dopo il ciclo per evitare l'evaporazione degli eluiti. Rimuovere le provette di eluizione contenenti il DNA e richiuderle.
- Nota:** dopo la procedura di purificazione automatica, il vassoio può essere caldo. Per rimuovere il vassoio dalla piattaforma dello strumento, tenerlo ai lati.
- Assicurarsi che i campioni vengano rimossi dallo strumento prima di eseguire un protocollo di igienizzazione UV per evitare di danneggiare l'acido nucleico purificato.
11. Rimuovere le cartucce e gli stantuffi dal vassoio Maxwell®. Smaltire come rifiuto pericoloso secondo le procedure della propria struttura. Non riutilizzare cartucce Maxwell® CSC Cartridge, stantuffi CSC/RSC o provette di eluizione.



7. Post-purificazione

Stabilisce se la concentrazione e la purezza del campione di DNA purificato sono conformi ai requisiti di ingresso dell'analisi diagnostica a valle prima di impiegarlo in tale analisi.

8. Valutazione delle prestazioni analitiche

Le prestazioni analitiche del Maxwell® CSC Blood DNA Kit sono state valutate usando campioni di sangue intero su un Maxwell® CSC Instrument. Prestazioni equivalenti del Maxwell® CSC Blood DNA Kit e del Maxwell® CSC 48 Instrument sono state dimostrate nel corso dello sviluppo di quello strumento.

8.A. Quantità, qualità e amplificabilità del DNA

Tabella 2. Resa e purezza del DNA da campioni di sangue intero con conteggi WBC vari. Il DNA estratto da otto replicati è stato testato per ciascuna delle condizioni elencate per valutare la quantità, qualità e amplificabilità del DNA. Il DNA è stato estratto da 300 µl di sangue intero con conta leucocitaria (WBC - white blood cell) compresa tra 4×10^6 – 10×10^6 WBC/ml ed eluito in 50 µl. L'assorbanza del DNA purificato è stata misurata a 230 nm, 260 nm, 280 nm e 340 nm. La concentrazione del DNA è stata determinata tramite assorbanza a 260 nm dopo aver sottratto l'assorbanza del bianco e corretto per il rumore dello strumento (assorbanza a 340 nm). Tutti i calcoli dell'assorbanza descritti in questa valutazione delle prestazioni sono stati effettuati secondo questa modalità. La concentrazione del DNA è stata moltiplicata per il volume del DNA eluito per determinare la resa, e sono stati calcolati i rapporti A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} per valutare la qualità del DNA. Le quantità di DNA ottenute con il Maxwell® CSC Blood DNA Kit sono state accettabili ($\geq 3,00$ pg/WBC) per tutti i campioni di sangue intero testato, indipendentemente dalla conta leucocitaria. Le rese medie di DNA purificato sono state $\geq 4,18$ pg/WBC, con rapporti $A_{260}/A_{280} \geq 1,89$ e $A_{260}/A_{230} \geq 1,68$.

Donatore	Resa totale media del DNA (µg) (n = 8)	Conta leucocitaria (WBC/ml)	Resa media del DNA per globulo bianco (pg)	Rapporto A_{260}/A_{280} medio	Rapporto A_{260}/A_{230} medio
1	6,0	$4,5 \times 10^6$	4,45	1,90	1,68
2	8,6	$6,9 \times 10^6$	4,18	1,89	1,91
3	12,4	$9,4 \times 10^6$	4,45	1,91	2,01

8.A. Quantità, qualità e amplificabilità del DNA (continua)

Tabella 3. Resa e purezza del DNA da sangue intero prelevato con anticoagulanti vari. La quantità e qualità sono state valutate per gli eluiti di DNA purificato preparati da sangue intero raccolto in provette comunemente usate contenenti EDTA, sodio citrato o eparina come anticoagulanti. I campioni di sangue sono stati refrigerati o congelati ed equilibrati a temperatura ambiente prima di procedere con l'estrazione del DNA. Il DNA è stato purificato da otto replicati da 300 µl per ciascun anticoagulante ed eluito in 50 µl. La concentrazione del DNA, la resa del DNA e i rapporti A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} sono stati calcolati e riportati nella tabella di seguito. Sono stati osservati rapporti di purezza e rese coerenti per il DNA estratto da tutti i campioni utilizzando il Maxwell® CSC Blood DNA Kit.

Tipo di provetta di raccolta del sangue	Resa totale media del DNA (µg) (n = 8)	Concentrazione media DNA (ng/µl)	Rapporto A_{260}/A_{280} medio	Rapporto A_{260}/A_{230} medio
EDTA	10,97	281,28	1,91	1,94
Sodio citrato	11,29	283,57	1,93	2,02
Eparina	11,99	307,48	1,94	2,08

Tabella 4. Amplificabilità del DNA estratto da sangue intero. L'amplificabilità è stata valutata mediante qPCR per il DNA estratto da sangue intero utilizzando il Maxwell® CSC Blood DNA Kit e il Maxwell® CSC Instrument. Ogni campione di DNA purificato è stato amplificato utilizzando una sequenza target CAPZA3 71 bp. Valori di C_q inferiori alla concentrazione più bassa della curva qPCR standard sono stati osservati per tutti i tipi di campioni; i valori rientravano nell'intervallo lineare dell'analisi.

Volume di sangue intero	Campione	C_q (cicli)
50 µl	1	27,17
	2	26,86
	3	26,95
	4	26,92
	5	27,23
	6	27,12
	7	27,21
	8	26,98
300 µl	1	26,90
	2	26,78
	3	26,84
	4	26,87
	5	26,66
	6	26,66
	7	26,84
	8	26,75

8.B. Riproducibilità

Tabella 5. Riproducibilità tra utenti e giorni. La riproducibilità della purificazione del DNA è stata determinata tra diversi utenti e giorni, utilizzando otto replicati da un singolo campione di sangue come indicato di seguito:

- Tre utenti hanno purificato il DNA da campioni replicati dello stesso campione di sangue intero utilizzando lo stesso Maxwell® CSC Instrument nello stesso giorno, con un ciclo di purificazione per utente, per caratterizzare la riproducibilità tra diversi utenti.
- Un utente ha purificato il DNA da campioni replicati dello stesso campione di sangue utilizzando lo stesso Maxwell® CSC Instrument, con un ciclo al giorno per un totale di 5 giorni per caratterizzare la riproducibilità tra diversi giorni.

Tutti i cicli di purificazione includevano otto replicati da 300 µl di sangue intero. La resa media, i rapporti A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} e il coefficiente di variazione percentuale (% CV) sono stati calcolati per i singoli utenti e giorni e tra di essi. Le rese e i rapporti di purezza del DNA estratto con il Maxwell® CSC Blood DNA Kit sono risultati riproducibili per tutte le variabili testate.

Variabile	Resa totale media del DNA (µg) (n = 8)			Rapporto A_{260}/A_{280} medio		Rapporto A_{260}/A_{230} medio	
			% CV		% CV		% CV
Utente	1	11,18	5,7	1,93	0,2	2,00	3,4
	2	10,02	8,8	1,91	0,2	1,92	5,2
	3	12,27	4,2	1,92	0,3	1,92	4,4
Media di tre utenti differenti		11,16	10,3	1,92	0,4	1,95	4,6
Giorno	1	11,88	5,3	1,93	0,4	1,93	5,1
	2	12,27	4,2	1,92	0,3	1,92	4,4
	3	12,78	6,9	1,93	0,3	1,93	3,6
	4	11,31	8,6	1,91	0,3	1,89	4,6
	5	12,92	5,5	1,93	0,3	1,92	3,0
Media di cinque giorni differenti		12,23	7,7	1,92	0,4	1,92	4,1

8.C. Sostanze interferenti (inibizione)

Tabella 6. Inibizione dell'amplificazione del DNA estratto da sangue intero contenente diversi anticoagulanti. L'inibizione nell'amplificazione del DNA è stata valutata per il DNA estratto da sangue intero utilizzando il Maxwell® CSC Blood DNA Kit e il Maxwell® CSC Instrument. Il DNA è stato purificato da campioni di sangue intero da 300 µl raccolti in provette contenenti EDTA, eparina e sodio citrato, con otto replicati per tipo di provetta. L'effetto delle sostanze interferenti che possono essere presenti nel DNA estratto è stato caratterizzato utilizzando un DNA di controllo positivo esogeno disponibile in commercio. Il DNA di controllo positivo esogeno è stato amplificato in presenza e in assenza dell'eluato di DNA da ciascun replicato di sangue intero, e i risultati sono stati confrontati per determinare l'eventuale presenza di fattori inibitori negli eluiti di DNA. La differenza del valore C_q (ΔC_q) per le due amplificazioni è stata calcolata sottraendo il valore C_q dell'amplificazione del DNA di controllo dal valore C_q dell'amplificazione contenente il DNA estratto con il Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Un valore ΔC_q inferiore a 2 cicli indica che l'eventuale carryover di inibitori dalle provette di raccolta del sangue, dal sangue intero o dai reagenti di purificazione del DNA ha avuto un effetto limitato sull'amplificazione. I valori ΔC_q medi per tutti gli eluiti di DNA erano $\leq 1,87$ cicli, dimostrando l'assenza di inibitori rilevabili dell'amplificazione del DNA nel DNA estratto con il Maxwell® CSC Blood DNA Kit.

	Valore C_q medio (Cicli di amplificazione; n = 8)	Valore ΔC_q medio (Cicli di amplificazione; n = 8)
Nessun eluito	30,49	NA
EDTA	32,36	1,87
Eparina	31,85	1,36
Sodio citrato	32,19	1,70

8.D. Contaminazione crociata

Per valutare se si è verificata una contaminazione crociata durante l'estrazione del DNA, campioni di sangue intero maschile e femminile sono stati eseguiti in posizioni alternate sul vassoio delle cartucce del Maxwell® CSC Instrument. Il DNA purificato è stato amplificato con un'analisi qPCR specifica per il cromosoma Y per rilevare DNA maschile e verificare che negli eluiti dei campioni femminili non fosse presente DNA contaminante del cromosoma Y. Qualsiasi risultato di concentrazione inferiore alla concentrazione più bassa sulla curva standard indica l'assenza di DNA contaminante. Non è stata rilevata alcuna contaminazione crociata quando il DNA è stato purificato utilizzando il Maxwell® CSC Blood DNA Kit e il Maxwell® CSC Instrument.

9. Valutazione delle prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche del Maxwell® CSC Blood DNA Kit sono state valutate da un laboratorio clinico esterno usando campioni di sangue umano e il Maxwell® CSC Instrument.

9.A. Amplificabilità del DNA

Tabella 7. Amplificabilità del DNA estratto da sangue intero utilizzando il Maxwell® CSC Blood DNA Kit e il metodo di riferimento del laboratorio. Per valutare l'amplificabilità del DNA, il DNA è stato purificato da 16 diversi campioni di sangue utilizzando un volume di campione immesso di 50 µl e un volume di eluizione di 100 µl. Il DNA è stato purificato dagli stessi campioni di sangue utilizzando un volume di campione immesso di 300 µl e un volume di eluizione di 50 µl per coprire la gamma di volumi immessi e di eluizione del Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Il DNA degli stessi campioni è stato purificato utilizzando il metodo standard di purificazione degli acidi nucleici del laboratorio (metodo di riferimento del laboratorio) a scopo di confronto. Il DNA eluito è stato utilizzato come template nel test diagnostico molecolare del laboratorio clinico per JAK2 V617F per dimostrare che il DNA estratto può essere amplificato con un'analisi qPCR. Questo test qPCR utilizza due serie di primer, una specifica per il gene wild type e l'altra specifica per la mutazione V617F. Poiché l'intento della valutazione delle prestazioni cliniche era di dimostrare che il DNA estratto con il Maxwell® CSC Blood DNA Kit può essere amplificato in un test diagnostico basato sull'amplificazione, e non di testare la sensibilità e la specificità del test diagnostico, per questo studio sono stati utilizzati solo i dati della qPCR del gene wild type.

Sono stati confrontati i risultati della resa e della qPCR per il DNA ottenuto dagli stessi campioni utilizzando il Maxwell® CSC Blood DNA Kit e il metodo di riferimento del laboratorio. I campioni estratti con il Maxwell® CSC Blood DNA Kit hanno utilizzato la combinazione del volume di sangue immesso più basso (50 µl) e del volume di eluizione più alto (100 µl) per rappresentare la resa minima del Maxwell® CSC Blood DNA Kit, mentre il metodo di riferimento del laboratorio ha utilizzato i volumi immessi e di eluizione standard di 400 µl ciascuno. La concentrazione di DNA, misurata come ng/µl, è stata determinata per 16 campioni di sangue separati mediante assorbanza a 260 nm. Il Maxwell® CSC Blood DNA Kit ha mostrato una resa del DNA simile rispetto al metodo di riferimento del laboratorio per tutti i campioni; il rapporto tra la resa del DNA del Maxwell® CSC Blood DNA Kit e il metodo di riferimento del laboratorio è stato inferiore a 2. Tutti i campioni hanno prodotto un valore C_q compreso nell'intervallo valido di 10–35.

Numero di campioni testati	Volume di campione immesso (µl), Maxwell® CSC	Volume di eluizione (µl), Maxwell® CSC	Maxwell® CSC soddisfa i criteri di accettazione (valore C_q entro l'intervallo lineare)	Concordanza di Maxwell® CSC con il metodo di riferimento del laboratorio per la resa del DNA
16	50	100	16 su 16	16 su 16
16	300	50	16 su 16	Metodo di riferimento del laboratorio non testato a questo volume immesso/di eluizione

9.B. Riproducibilità

Tabella 8. Riproducibilità tra i tester. Il DNA è stato purificato da 8 diversi campioni di sangue intero da 2 tester diversi utilizzando il Maxwell® CSC Instrument e il Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Gli eluiti di ciascun campione sono stati analizzati in duplicato mediante qPCR per determinare la resa seguendo la procedura di amplificazione di JAK2 V617F del laboratorio clinico e utilizzando i dati dell'analisi del gene wild type per questa analisi. I risultati della resa e della qPCR per il DNA ottenuto dagli stessi campioni da due tester diversi che hanno utilizzato il sistema Maxwell® CSC sono stati confrontati per due diverse combinazioni di volumi immessi e di eluizione, utilizzando 8 diversi campioni per ciascuna combinazione. Il DNA di tutti i campioni ottenuti da entrambi i tester ha prodotto un valore C_q all'interno dell'intervallo valido di 10–35. La concentrazione di DNA, misurata come ng/μl di DNA nell'eluato, è stata determinata mediante assorbanza a 260 nm e il rapporto tra la resa del DNA ottenuta dallo stesso campione dal Tester 1 e quella ottenuta dal Tester 2 è compreso tra 0,5 e 2,0 per tutti i campioni.

Numero di campioni per Tester	Volume di campione immesso (μl), Maxwell® CSC	Volume di eluizione (μl), Maxwell® CSC	Valore Ct all'interno dell'intervallo lineare dell'analisi; 8 campioni per Tester	Concordanza tra il Tester 1 e il Tester 2
8	50	100	16 su 16	8 su 8
8	300	50	16 su 16	8 su 8

9.C. Contaminazione crociata

La contaminazione crociata durante la purificazione del DNA nell'ambiente di utilizzo previsto per gli utenti è stata valutata per gli eluiti preparati da sangue intero utilizzando il Maxwell® CSC Blood DNA Kit e il Maxwell® CSC Instrument. I campioni di sangue e i controlli negativi (bianchi di acqua) sono stati eseguiti in posizioni alternate sul vassoio delle cartucce del Maxwell® CSC. Il DNA è stato purificato da 8 campioni di sangue diversi, con un volume di campione immesso di 300 μl e un volume di eluizione di 50 μl, e da 8 campioni di controllo negativo.

Gli eluiti di ciascun campione di controllo negativo sono stati analizzati in duplicato mediante qPCR seguendo la procedura di amplificazione di JAK2 V617F del laboratorio di analisi. Tutti i criteri di accettazione sono stati soddisfatti. Non è stato rilevato DNA contaminante in nessuno degli eluiti di controllo negativo.

10. Risoluzione dei problemi

Per domande non specificamente trattate nel presente manuale, rivolgersi alla filiale o al distributore Promega locale. Le informazioni relative ai contatti sono disponibili all'indirizzo: **www.promega.com**.

E-mail: **techserv@promega.com**

Problema	Cause e commenti
Concentrazione inferiore alle attese	Sangue sottoposto a più cicli di congelamento-scongelo può avere DNA degradato. Usare campioni prelevati e conservati secondo quanto elencato nella Sezione 3.
Un campione di sangue intero di 300 µl contenente tra 4×10^6 e 10×10^6 wbc/ml dovrebbe produrre >80 ng/µl di DNA genomico in un volume di eluizione di 50 µl (misurato tramite assorbanza a 260 nm).	Il campione di sangue intero aveva una bassa conta leucocitaria. La resa di gDNA dai campioni di sangue dipende dal numero di leucociti presenti nel campione.
	La soluzione di proteinasi K non è stata aggiunta, è stata aggiunta in quantità insufficiente o la proteinasi K non è stata mescolata efficacemente con il campione ematico prima dell'aggiunta del tampone di lisi. Lisi e resa dipendono dalla completa estrazione con Proteinasi K. Se quest'ultima non è stata aggiunta come da passaggio 3 della Sezione 5.A, il campione ematico risultante sarà rosso. I campioni trattati con la Proteinasi K assumono un colore marrone verdastro, che può essere utilizzato come indicatore visivo che la Proteinasi K è stata aggiunta al campione.
	Il campione di sangue intero non è stato mescolato prima dell'estrazione. Assicurarsi di mescolare i campioni di sangue intero prima del ciclo di estrazione affinché i leucociti siano in sospensione.
Purezza inferiore alle attese	La soluzione di proteinasi K non è stata aggiunta, è stata aggiunta in quantità insufficiente o la proteinasi K non è stata mescolata efficacemente con il campione ematico prima dell'aggiunta del tampone di lisi. Lisi e purezza dipendono dalla completa estrazione con Proteinasi K. Se quest'ultima non è stata aggiunta come da passaggio 3 della Sezione 5.A, il campione ematico risultante sarà rosso. I campioni trattati con la Proteinasi K assumono un colore marrone verdastro, che può essere utilizzato come indicatore visivo che la Proteinasi K è stata aggiunta.
Un campione di sangue intero di 300 µl contenente tra 4×10^6 e 10×10^6 wbc/ml in un volume di eluizione di 50 µl dovrebbe produrre gDNA con un rapporto A_{260}/A_{280} (purezza misurata tramite assorbanza a 260 nm divisa per l'assorbanza a 280 nm) di almeno 1,7 o maggiore e un rapporto A_{260}/A_{230} (purezza misurata tramite assorbanza a 260 nm divisa per l'assorbanza a 230 nm) di almeno 1,5 o maggiore.	

Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo che ha portato, o potrebbe portare, alla morte o a lesioni gravi di un utente o di un paziente deve essere immediatamente segnalato al fabbricante. Gli utenti con sede nell'Unione Europea devono inoltre segnalare qualsiasi incidente grave all'Autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utente e/o il paziente.

11. Bibliografia

1. Henry, J.B. (2001) *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20th ed., W.B. Saunders Company, 509.

12. Prodotti correlati

Strumento e accessori

Prodotto	Quantità	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	1 cadauno	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 cadauno	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 cadauno	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 cadauno	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 cadauno	AS8402
Microtube, 1,5 ml	1,000/conf.	V1231

*Per uso diagnostico in vitro. Questo prodotto è disponibile solo in alcuni Paesi.

Kit di reagenti Maxwell® CSC

Visitare **www.promega.com** per l'elenco dei kit di purificazione Maxwell® CSC disponibili.

13. Riepilogo delle modifiche

Sono state apportate le seguenti modifiche alla revisione del 10/22 di questo documento:

1. La Sezione 3 è stata rinominata in Finalità prevista/uso previsto del prodotto.
2. Sono state aggiunte le Sezioni 8 e 9 e rinumerate le sezioni seguenti.
3. Documento aggiornato in conformità al Regolamento (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medici diagnostici in vitro.

^(a)Brevetto USA n. 6,855,499 e altri brevetti.

^(b)Brevetto USA n. 7,329,488 e brevetto Corea n. 10-0483684.

© 2012–2022 Promega Corporation. Tutti i diritti riservati.

Maxwell è un marchio registrato di Promega Corporation.

I prodotti possono essere coperti da brevetti già rilasciati o in corso di rilascio o possono essere soggetti a determinate limitazioni. Per ulteriori informazioni visitare il nostro sito Web.

Specifiche e prezzi sono soggetti a modifica senza preavviso.

Le descrizioni dei prodotti sono soggette a modifica. Per informazioni aggiornate sui prodotti Promega rivolgersi ai Promega Technical Services oppure consultare il catalogo Promega online.