

MANUALE TECNICO

Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Istruzioni per l'uso del prodotto
AS1860

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



ISTRUZIONI PER L'USO
DEL PRODOTTO

AS1860



PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germania

Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid 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 prodotto, contattare i Promega Technical Services all'indirizzo e-mail: techserv@promega.com

1. Descrizione	2
2. Componenti del prodotto e condizioni di conservazione	3
3. Finalità prevista/uso previsto del prodotto	5
4. Limitazioni all'utilizzo del prodotto	5
5. Prima di iniziare	6
6. Preparazione del campione	7
6.A. Preparazione dei campioni di feci per l'utilizzo con Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	7
6.B. Preparazione dei campioni di BAL o espettorato per l'utilizzo con Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	8
6.C. Preparazione dei campioni di urina per l'utilizzo con Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	9
6.D. Preparazione dei campioni di plasma, mezzo di trasporto virale o mezzo di trasporto per Pap test per l'utilizzo con Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	10
6.E. Preparazione della Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge	10
7. Impostazione ed esecuzione del Maxwell® Instrument	12
8. Conservazione degli acidi nucleici eluiti	13
9. Valutazione delle prestazioni analitiche	14
9.A. Quantità, qualità e amplificabilità del DNA	14
9.B. Quantità, qualità e amplificabilità dell'RNA	15
9.C. Riproducibilità	17
9.D. Inibizione dell'amplificazione a causa di sostanze interferenti	20
9.E. Contaminazione crociata	24
10. Valutazione delle prestazioni cliniche	24
11. Creazione di un ambiente privo di ribonucleasi	28
12. Bibliografia	28
13. Risoluzione dei problemi	29
14. Prodotti correlati	30

Il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit è disponibile solo in alcuni in paesi.

1. Descrizione

Il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit^(a) viene utilizzato con i Maxwell® Instrument specificati nella Tabella 1 e fornisce un metodo semplice per la preparazione e la purificazione efficiente e automatizzata del campione di acido nucleico totale del patogeno. I Maxwell® CSC Instrument sono progettati per l'uso con cartucce di reagenti predefinite e procedure di purificazione preprogrammate, massimizzando la semplicità e la convenienza. Il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit è progettato per eseguire l'estrazione automatica di acido nucleico totale batterico, virale e del parassita dai seguenti campioni biologici umani: campioni di feci, espettorato, lavaggio broncoalveolare, urina, plasma, tamponi nasofaringei e tamponi cervicali in mezzo di trasporto. Il metodo Maxwell® Instrument per il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit può elaborare da uno fino al numero massimo di campioni del Maxwell® Instrument in circa 40 minuti. Il ridotto volume di eluizione di 100 µl si traduce in acido nucleico concentrato e purificato per applicazioni a valle come la PCR quantitativa (qPCR) o la RT-PCR quantitativa (RT-qPCR). Dopo un passaggio di pre-elaborazione che consiste in una breve lisi, il campione viene aggiunto alla Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge e la restante elaborazione è completamente automatizzata.

Tabella 1. Strumenti supportati.

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

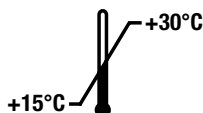
Principio del metodo

Il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit purifica i campioni utilizzando particelle paramagnetiche, che forniscono una fase solida mobile per ottimizzare la cattura del campione, il lavaggio e la purificazione dell'acido nucleico. I Maxwell® Instrument sono strumenti per la gestione di particelle magnetiche che legano efficacemente gli acidi nucleici alla particella paramagnetica nel primo pozzetto di una cartuccia preriempita. I campioni vengono processati attraverso una serie di lavaggi prima che l'acido nucleico totale venga eluito.

2. Componenti del prodotto e condizioni di conservazione

PRODOTTO	QUANTITÀ	CAT. #
Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	48 prep	AS1860

Per uso diagnostico in vitro. Esclusivamente ad uso professionale. Sufficiente per 48 isolamenti. Le cartucce sono esclusivamente mono-uso.



Include:

- 150 ml Tampone di diluizione (ST1)
- 900 µl 1-tioglicerolo
- 20 ml Tampone di lisi
- 2 × 1 ml Soluzione proteinasi K (PK)
- 50 Stantuffi CSC/RSC
- 48 Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ)
- 50 Provette di eluizione (0,5 ml)
- 20 ml Tampone di eluizione

Condizioni di conservazione: al ricevimento, rimuovere il 1-tioglicerolo e conservarlo a temperature comprese tra +2°C e +10°C. Conservare gli altri componenti del kit a temperatura ambiente (tra +15°C e +30°C).



Informazioni sulla sicurezza: le cartucce contengono etanolo, isopropanolo e cloridrato di guanidina. L'etanolo e l'isopropanolo devono essere considerati infiammabili, dannosi e irritanti. Il cloridrato di guanidina deve essere considerato tossico, dannoso e irritante. Per informazioni dettagliate sulla sicurezza, consultare l'SDS.



Le cartucce sono progettate per essere utilizzate con sostanze potenzialmente infettive. Indossare idonee protezioni (p. es., guanti e occhiali) nel maneggiare le sostanze infettive. Attenersi alle linee guida della propria struttura per la gestione e lo smaltimento di tutte le sostanze infettive utilizzate con questo sistema.



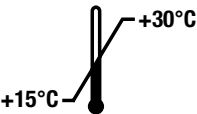
Attenzione: maneggiare le cartucce con attenzione; i bordi possono essere taglienti.

Informazioni aggiuntive: i componenti del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit sono qualificati e comprovati per funzionare insieme. **Non** mescolare i 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. Per ulteriori informazioni sulla sicurezza, vedere la scheda di sicurezza (Safety Data Sheet) disponibile all'indirizzo:

www.promega.com

2. Componenti del prodotto e condizioni di conservazione (continua)

Legenda dei simboli

Simbolo	Spiegazione	Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Non riutilizzare
	Conservare a una temperatura da +15°C a +30°C.		Fabbricante
	Attenzione		Infiammabile
	Rischio per la salute		Contenuto sufficiente per "n" test
	Avvertenza. Pericolo di schiacciamento.		Avvertenza. Rischio biologico.
	Numero lotto		Numero catalogo
	Conformità alle normative europee		Rappresentante autorizzato

3. Finalità prevista/uso previsto del prodotto

Il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit è destinato all'uso in combinazione con i Maxwell® CSC Instrument e il metodo Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid come dispositivo medico-diagnostico in vitro (IVD) per l'isolamento automatico di acido nucleico totale virale, batterico e/o del parassita dai seguenti tipi di campioni umani: campioni di feci, espettorato, lavaggio broncoalveolare, tamponi nasofaringei in mezzo di trasporto, tamponi cervicali in mezzo di trasporto, urina e plasma. L'acido nucleico totale purificato è adatto per l'impiego in analisi diagnostiche in vitro basate sull'amplificazione.

Il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit è previsto per un impiego a una temperatura ambiente compresa tra 15°C e 30°C. L'impiego al di fuori di questi valori può comportare risultati non ottimali.

Il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit è destinato all'uso esclusivamente professionale. I risultati diagnostici ottenuti utilizzando l'acido nucleico totale purificato grazie a questo sistema devono essere interpretati congiuntamente ad altri esami clinici o di laboratorio.

4. Limitazioni all'utilizzo del prodotto

Le prestazioni del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit sono state valutate per i seguenti patogeni usando i tipi di campioni elencati:

- Batteri: campioni di feci, espettorato, lavaggio broncoalveolare, tamponi nasofaringei in mezzo di trasporto, tamponi cervicali in mezzo di trasporto, urina.
- Parassiti: campioni di feci, tamponi cervicali in mezzo di trasporto, urina.
- Virus: campioni di feci, espettorato, lavaggio broncoalveolare, tamponi nasofaringei in mezzo di trasporto, tamponi cervicali in mezzo di trasporto, urina, plasma.

Il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit non è destinato all'uso su campioni non umani.

Qualsiasi applicazione diagnostica a valle che utilizza acidi nucleici totali purificati con il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit deve includere idonei controlli. L'utente è responsabile della verifica delle caratteristiche delle prestazioni necessarie per le applicazioni diagnostiche a valle.

5. Prima di iniziare

Fornitura materiali a cura dell'utente

- provette da 1,5–2,0 ml per l'incubazione dei campioni (p. es., ClickFit Microtube, 1,5 ml [Cat.# V4741]; consigliate per evitare che il tappo si apra durante il riscaldamento)
- provetta conica da 15 ml o 50 ml per la preparazione della soluzione di lisi
- agitatore da banco
- pipette e puntali per il trasferimento del campione nelle cartucce preriempite di reagente
- blocco termostato o bagnetto impostato a 56°C
- blocco termostato impostato a 95°C per i campioni di espettorato e di BAL
- **opzionale:** 1X PBS per diluire i campioni di BAL e espettorato
- **opzionale:** centrifuga per la pre-elaborazione di campioni di urina
- **opzionale:** perline di zirconio da 0,1–0,5 mm per la pre-elaborazione di campioni di feci (p. es. perline di macinazione ZR, Zymo [Cat. #S6012-50])
- provette per campioni di feci, espettorato, lavaggio broncoalveolare (BAL), mezzo di trasporto virale (VTM), mezzo di trasporto per Pap test, plasma e urina



Per la manipolazione di campioni di derivazione umana, si raccomanda di seguire le precauzioni relative ai patogeni a trasmissione ematica.

Per i campioni di plasma, raccogliere il sangue in provette con anticoagulante EDTA. Evitare l'uso di provette di raccolta del sangue contenenti eparina, perché l'eparina potrebbe inibire le amplificazioni a valle.

Le raccomandazioni generali riportate di seguito si riferiscono alla preparazione e alla conservazione di campioni (sulla base delle fonti bibliografiche 1–4):

1. Separare il plasma dalle cellule entro 1 ora dal prelievo del sangue centrifugando a $1.500 \times g$ per 20 minuti a 25°C, quindi trasferire lo strato di plasma in una provetta pulita. Conservare i campioni di plasma a 2–8°C per un massimo di 24 ore, o congelare i campioni che non vengono trattati entro 24 ore a –20°C per un massimo di 5 giorni.
2. Per i tamponi del mezzo di trasporto virale, utilizzare solo tamponi in fibra sintetica con astine in plastica. Non usare tamponi di alginato di calcio o tamponi con astine di legno, perché possono contenere sostanze che inibiscono il test PCR. Posizionare immediatamente i tamponi in provette sterili contenenti 2–3 ml di mezzo di trasporto virale. Conservare il mezzo di trasporto virale e i campioni a 2–8°C per un massimo di 72 ore, oppure congelare i campioni a –70°C. Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento e non conservare i campioni in un congelatore no frost. Le condizioni specifiche di raccolta e conservazione possono variare in base al virus isolato.
3. Conservare i campioni di urina fresca a 4°C per un massimo di 24 ore prima dell'elaborazione. Per conservarli più a lungo, aggiungere EDTA a una concentrazione finale di 20 mM. Per evitare la lisi cellulare, conservare i campioni di urina stabilizzata a 4°C. Per evitare la lisi cellulare, l'urina non deve essere congelata. Se l'urina viene congelata e scongelata, è possibile che si formi un precipitato. Mescolare e/o riscaldare il campione per risolubilizzare il precipitato. Evitare di centrifugare il campione per rimuovere il precipitato, perché questo processo può rimuovere cellule patogene intatte.

4. Conservare i campioni di BAL e di espettorato a 2–8°C per un massimo di 72 ore, oppure congelare i campioni a –70°C. Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento e non conservare i campioni in un congelatore no frost. Le condizioni specifiche di raccolta e conservazione possono variare in base al patogeno isolato.
5. I campioni di feci devono essere congelati a una temperatura compresa tra –20°C e –80°C prima dell'elaborazione.

6. Preparazione del campione

6.A. Preparazione dei campioni di feci per l'utilizzo con Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

1. Porre 100–500 mg di campione fecale in una provetta per microcentrifuga da 2 ml con tappo a vite.
2. Aggiungere 1 ml di tampone di diluizione (ST1) per rimettere in sospensione il campione. Mescolare energicamente tramite agitatore per un tempo compreso tra 30 secondi e 1 minuto. Usare puntali nuovi per ciascun campione per evitare la contaminazione tra campioni.
3. Centrifugare il campione a $1.000 \times g$ per 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Trasferire il surnatante in una provetta di dimensioni adeguate e misurare il volume.
5. Aggiungere un volume pari a 2X di tampone di diluizione (ST1) per ottenere una diluizione 1:2 di un campione di feci [p. es. 1 ml di surnatante fecale + 2 ml di tampone di diluizione (ST1)]. Usare questa diluizione di campioni di feci per le purificazioni di DNA.

Nota: per estrarre l'RNA virale diluire ulteriormente il campione di feci con un rapporto di 1:8 in Nuclease-Free Water (p. es., 100 µl di diluizione 1:2 di un campione di feci + 700 µl di Nuclease-Free Water). Conservare il campione a temperatura ambiente fino all'elaborazione.

Metodo opzionale di macinazione tramite perline per l'estrazione di DNA da patogeni difficili da lisare in campioni di feci

Nota: per estrarre gli acidi nucleici di patogeni difficili da lisare come ad esempio batteri gram-positivi o protozoi nei campioni di feci, è possibile eseguire un ulteriore passaggio di macinazione tramite perline. Questa ulteriore omogeneizzazione può aumentare la resa della purificazione degli acidi, se il metodo standard di lisi è insufficiente.

- a. Trasferire da 600 µl a 1 ml di campione di feci diluito in una provetta da 2 ml contenente perline e chiudere la provetta.
- b. Porre le provette su un agitatore a piastra o equivalente e agitare o macinare tramite perline alla velocità massima per 10 minuti.
- c. Centrifugare le provette in una microcentrifuga per 1 minuto alla velocità massima per separare le perline dal campione.
6. Aggiungere 300 µl di lisato di feci a una nuova provetta da 1,5 ml.
7. Aggiungere 300 µl di tampone di lisi e mescolare tramite agitatore per 10 secondi.
8. Aggiungere 30 µl di soluzione Proteinasi K e mescolare brevemente con l'agitatore per mescolare.
9. Incubare a 56°C per 20 minuti.
10. Procedere alla preparazione della Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (Sezione 6.E).

6.B. Preparazione dei campioni di BAL o espettorato per l'utilizzo con Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

1. Se congelati, scongelare i campioni di espettorato o di BAL a temperatura ambiente.
Nota: per ridurre la viscosità dei campioni di BAL e di espettorato, diluire in un volume uguale di 1X PBS, omogenizzare meccanicamente oppure diluire e omogenizzare prima dell'elaborazione.
2. Per ogni campione, aggiungere 100–300 µl a una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml. (Si consiglia l'uso di una pipetta con foro largo). Usare puntali nuovi per ciascun campione per evitare la contaminazione tra campioni.
3. Aggiungere 12 µl di 1-tioglicerolo e pipettare per mescolare.
Nota: pipettare lentamente perché la soluzione è viscosa.
4. Aggiungere 300 µl di tampone di lisi e mescolare tramite agitatore per 10 secondi.
5. Incubare a 95°C per 5 minuti. Lasciar raffreddare sul banco di lavoro per 2 minuti.
6. Aggiungere 30 µl di soluzione Proteinasi K e mescolare brevemente con l'agitatore per mescolare.
7. Incubare a 56°C per 20 minuti.
8. Procedere alla preparazione della Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (Sezione 6.E).

6.C. Preparazione dei campioni di urina per l'utilizzo con Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Preparazione di piccoli volumi di campione (300 µl di urina):

1. Mescolare brevemente l'urina tramite agitatore per rimettere in sospensione eventuali cellule depositate.
2. Per ogni campione, aggiungere 300 µl di urina a una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml. Usare puntali nuovi per ciascun campione per evitare la contaminazione tra campioni.
3. Aggiungere 300 µl di tampone di lisi e mescolare tramite agitatore per 10 secondi.
4. Aggiungere 30 µl di soluzione Proteinasi K e mescolare brevemente con l'agitatore per mescolare.
5. Incubare a 56°C per 20 minuti.
6. Procedere alla preparazione della Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (Sezione 6.E).

Preparazione di grande volumi di campione (30 ml di urina):

1. Mescolare brevemente l'urina tramite agitatore per rimettere in sospensione eventuali cellule depositate.
2. Per ogni campione, aggiungere 30 ml di urina a una provetta da 50 ml. Usare puntali nuovi per ciascun campione per evitare la contaminazione tra campioni.
3. Centrifugare i campioni di urina a 2.000 x g per 10 minuti.
4. Rimuovere il surnatante con una pipetta, facendo attenzione a non spostare il pellet.
Nota: per preservare l'integrità del pellet è possibile lasciare una piccola quantità di liquido della provetta (fino a un massimo di 300 µl).
5. Aggiungere 300 µl di tampone di eluizione alla provetta e pipettare per rimettere in sospensione il pellet.
6. Trasferire il lisato a una provetta da 1,5 ml.
7. Aggiungere 30 µl di soluzione Proteinasi K e mescolare brevemente con l'agitatore per mescolare.
8. Incubare a 56°C per 20 minuti.
9. Procedere alla preparazione della Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (Sezione 6.E).

6.D. Preparazione dei campioni di plasma, mezzo di trasporto virale o mezzo di trasporto per Pap test per l'utilizzo con Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

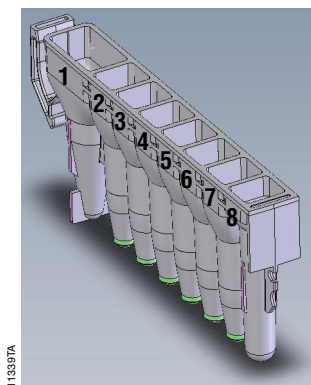
1. Se congelati, scongelare il plasma o i mezzi a temperatura ambiente e mescolare brevemente tramite agitatore.
2. Per ogni campione, aggiungere 300 µl di plasma o mezzo contenente campione biologico a una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml. Usare puntali nuovi per ciascun campione per evitare la contaminazione tra campioni.
3. Aggiungere 300 µl di tampone di lisi e mescolare tramite agitatore per 10 secondi.
4. Aggiungere 30 µl di soluzione Proteinasi K e mescolare brevemente con l'agitatore per mescolare.
5. Incubare a 56°C per 20 minuti.
6. Procedere alla preparazione della Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (Sezione 6.E).

6.E. Preparazione della Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge

1. Cambiare i guanti prima di maneggiare cartucce, stantuffi e provette di eluizione (0,5 ml). Posizionare le cartucce da usare nel(i) vassoio(i) della piastra con la camera n.1 (la camera più grande della cartuccia) a distanza dalle provette di eluizione. Premere sulla cartuccia fino a quando non scatta in posizione. Staccare delicatamente il sigillo in modo che tutta la plastica venga rimossa dalla parte superiore della cartuccia. Prima di posizionare le cartucce nello strumento assicurarsi che siano stati rimossi il nastro sigillante e qualunque residuo di adesivo.
2. Posizionare uno stantuffo nella camera n.8 di ciascuna cartuccia.
3. Porre nell'apposita posizione una provetta di eluizione vuota (0,5 ml) per ciascuna cartuccia del vassoio.
4. Aggiungere 100 µl di tampone di eluizione sul fondo di ciascuna provetta di eluizione.
5. Centrifugare brevemente i campioni lisati in una microcentrifuga per raccogliere il liquido sul fondo della provetta. Trasferire il campione lisato nella camera n.1 (la camera più grande) della cartuccia. Non aggiungere nient'altro alla cartuccia oltre al campione lisato.
6. Procedere alla Sezione 7, Impostazione ed esecuzione del Maxwell® Instrument.

Note:

- a. 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 sulle parti dello strumento.
- b. Usare esclusivamente le provette di eluizione da 0,5 ml in dotazione nel kit, perché altre provette potrebbero essere incompatibili con il Maxwell® Instrument.



Componenti aggiunti dall'utente alle camere

1. Campione lisato
8. Stantuffo CSC/RSC

Figura 1. Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge. Il campione pre-elaborato viene aggiunto alla camera n.1 e uno stantuffo viene aggiunto alla camera n.8.



Figura 2. Preparazione e allestimento dei vassoi. Il tampone di eluizione viene aggiunto alle provette di eluizione come illustrato. Gli stantuffi sono nella camera n.8 della cartuccia.

7. Impostazione ed esecuzione del Maxwell® Instrument

Per informazioni dettagliate, consultare il manuale tecnico specifico del Maxwell® Instrument in uso (vedere 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 si accende, procede a un'auto-verifica e tutte le parti mobili vengono portate nella posizione base.
2. Toccare **Avvia** per iniziare il processo di esecuzione di un metodo.
3. Scansionare o inserire il codice a barre del metodo nell'angolo superiore destro dell'etichetta del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit per selezionare automaticamente il metodo da eseguire (Figura 3).

Nota: il codice a barre del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit è necessario per la purificazione sui Maxwell® CSC Instrument. L'etichetta del kit contiene due codici a barre. Il codice a barre del metodo è indicato nella sottostante 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 del metodo da leggere. Il codice a barre da leggere per avviare un ciclo di purificazione è indicato nella casella rossa nell'angolo in alto a destra dell'etichetta del kit.

4. Nella schermata 'Impostazione cartuccia' toccare le posizioni della cartuccia per selezionare/deselezionare 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® Instrument a 48 posizioni, 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 siano state eseguite. Verificare che i campioni siano stati aggiunti alla camera n.1 delle cartucce, che le cartucce siano caricate sullo strumento e che nella camera n.8 siano presenti le provette di eluizione stappate con tampone di eluizione e stantuffi. Trasferire il vassoio/i vassoi contenente/i le cartucce preparate sulla piattaforma del Maxwell® Instrument.

Inserimento del Maxwell® Deck Tray: tenere il vassoio dai lati per evitare di spostare le cartucce dal vassoio. Accertarsi che il vassoio sia posizionato nel Maxwell® Instrument con le provette di eluizione più vicine 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 davanti o dietro lo strumento.

6. Confermare che tutti i passaggi di pre-elaborazione sono stati eseguiti e toccare **Avvia** per chiudere lo sportello dello strumento e avviare l'elaborazione.

Nota: quando si usa un Maxwell® Instrument a 48 posizioni, se è stato abilitato il Vision System, il vassoio/i vassoi saranno scansionati 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 lettura dei vassoi e iniziare il ciclo di estrazione.



Avvertenza: pericolo di schiacciamento.

Maxwell® Instrument inizierà immediatamente il ciclo di purificazione. Lo schermo visualizzerà informazioni che includono l'utente che ha iniziato il ciclo, la fase del metodo in corso di esecuzione e il tempo approssimativo rimanente nel ciclo.

Note:

- a. Toccando il pulsante **Interrompi** il ciclo sarà abbandonato. Tutti i campioni di un ciclo interrotto andranno persi.
 - b. 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**. I campioni andranno persi. Non cercare di ripurificare campioni se l'esecuzione di uno strumento è stata interrotta.
7. 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 tecnico del Maxwell® Instrument in uso (Tabella 1) per eseguire un processo di **Rimozione Stantuffi** per cercare di scaricare gli stantuffi.
 8. Rimuovere il vassoio/i vassoi dallo strumento. Rimuovere le provette di eluizione contenenti gli acidi nucleici totali dei patogeni e richiuderle. Se sono presenti particelle paramagnetiche nelle provette di eluizione, centrifugare a 10.000–20.000 × g per un tempo compreso tra 30 secondi e 1 minuto, poi trasferire il surnatante nelle provette di conservazione (non fornite). Al termine del ciclo, verrà visualizzato il report del ciclo di estrazione. Dalla schermata "Vista report", è possibile stampare il report, esportarlo, o ambedue.
 9. Rimuovere le cartucce e gli stantuffi dal vassoio e smaltirli come rifiuti pericolosi secondo le linee guida raccomandate presso la propria struttura. Non riutilizzare le cartucce di reagenti, gli stantuffi né le provette di eluizione.

Nota: assicurarsi che i campioni siano rimossi prima di eseguire qualsiasi trattamento dello strumento con raggi UV necessario, per evitare di danneggiare l'acido nucleico.

8. Conservazione degli acidi nucleici eluiti

Se i campioni non vengono elaborati immediatamente, conservare il DNA del patogeno eluito su ghiaccio a 4°C per massimo 24 ore. Per conservarlo più a lungo, congelare a –20°C o –70°C. L'RNA è meno stabile e pertanto è preferibile testarlo nelle analisi a valle immediatamente dopo l'isolamento. Se lo si testa poco dopo l'isolamento, conservare l'RNA del patogeno su ghiaccio o a 4°C. In alternativa, conservare l'RNA del patogeno eluito a –70°C. Consultare le istruzioni per le applicazioni a valle per la conservazione di campioni specifici e le raccomandazioni per la manipolazione.

9. Valutazione delle prestazioni analitiche

Le prestazioni analitiche del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit sono state valutate usando vari tipi di campioni arricchiti con patogeni inattivati processati sul Maxwell® CSC e sul Maxwell® CSC 48 Instrument.

9.A. Quantità, qualità e amplificabilità del DNA

L'acido nucleico totale è stato estratto da replicati da 300 µl di un campione di feci in sospensione, ognuno arricchito con approssimativamente $2,5 \times 10^4$ copie di *Giardia lamblia* inattivato utilizzando il metodo di pre-elaborazione standard o quello di macinazione tramite perline. L'acido nucleico totale è stato eluito usando 100 µl di tampone di eluizione. Cinque microlitri di ogni eluito non diluito sono stati utilizzati in un'analisi della qPCR per amplificare il target di DNA specifico per *G. lamblia*. Il C_q medio generato con il metodo standard è di 34,39 cicli. Il C_q medio generato con il metodo di macinazione tramite perline è di 29,35 cicli.

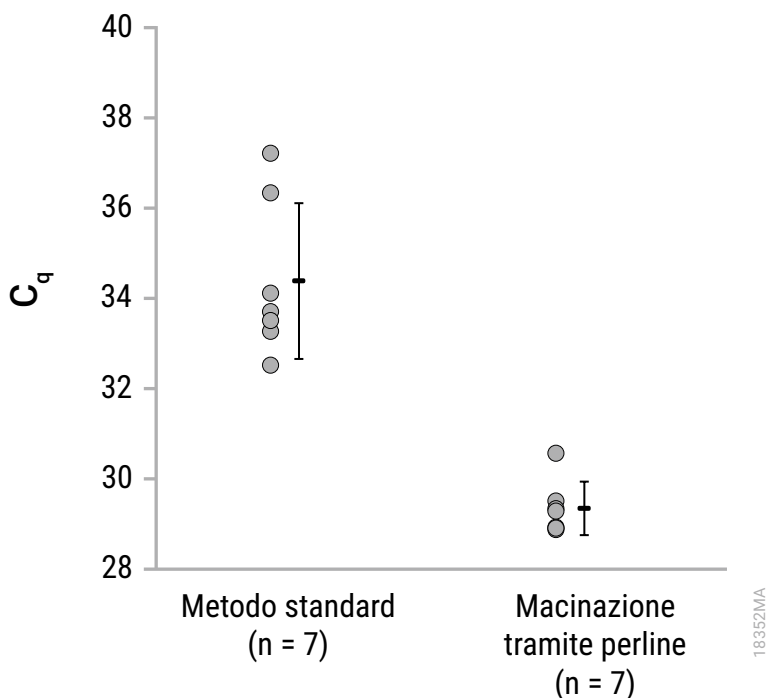


Figura 4. Amplificazione della sequenza target di DNA di *G. lamblia* usando l'acido nucleico totale estratto da campioni di feci con il metodo standard rispetto al metodo di macinazione tramite perline.

9.B. Quantità, qualità e amplificabilità dell'RNA

Per dimostrare che le prestazioni del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit sono simili quando viene utilizzato con il Maxwell® CSC o con il Maxwell® CSC 48 Instrument, l'acido nucleico totale è stato estratto, usando il kit con entrambi gli strumenti, da otto replicati da 300 µl di campioni di espettorato arricchiti con 1×10^4 copie del virus SARS CoV-2 inattivato. L'acido nucleico totale è stato eluito usando 100 µl di tampone di eluizione, e 5 µl di ogni eluito sono stati usati in un'analisi della RT-qPCR per amplificare una sequenza target di RNA specifica per il SARS CoV-2. Il confronto tra i risultati dell'analisi RT-qPCR ottenuti dall'acido nucleico totale estratto usando il Maxwell® CSC Instrument e il Maxwell® CSC 48 Instrument ha mostrato che tutti i valori $|\Delta C_q|$ sono pari a $\leq 0,59$ cicli, con un $|\Delta C_q|$ medio di 0,16 cicli.

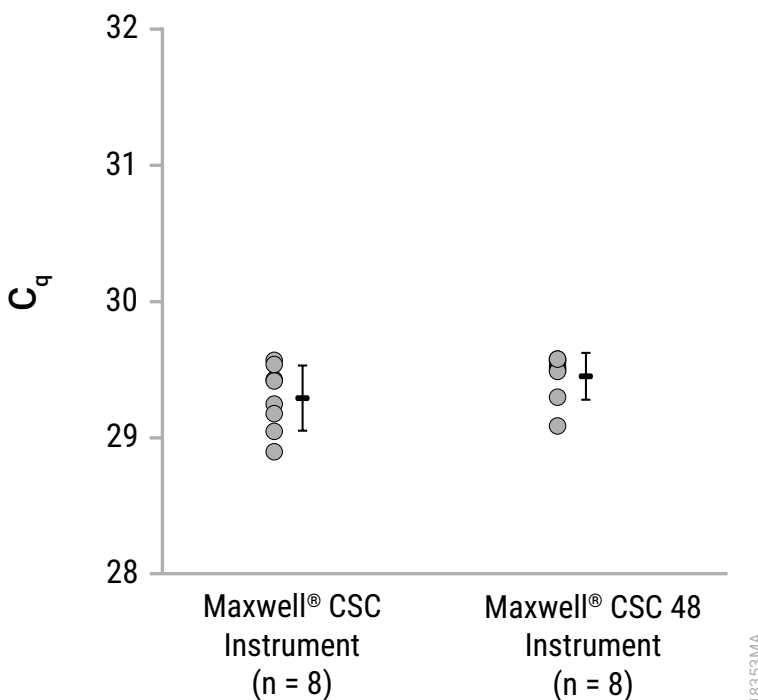


Figura 5. Amplificabilità dell'acido nucleico totale estratto da campioni di espettorato contenenti SARS CoV-2 utilizzando il Maxwell® CSC o il Maxwell® CSC 48 Instrument.

9.B. Quantità di RNA, qualità e amplificabilità (continua)

L'acido nucleico totale è stato purificato parallelamente da campioni di lavaggio broncoalveolare (BAL) da 300 µl e da 100 µl, ognuno arricchito con 1×10^4 copie di virus SARS CoV-2 inattivato per valutare l'effetto di quantità diverse della matrice campione sull'amplificabilità. L'acido nucleico totale è stato eluito usando 100 µl di tampone di eluizione, e 5 µl di ogni eluito non diluito sono stati usati in un'analisi della RT-qPCR per amplificare una sequenza target RNA specifica per il SARS CoV-2. Tutti i valori di C_q per l'acido nucleico totale purificato da 300 µl di espettorato sono risultati $\leq 30,86$ cicli, con un C_q medio di 30,56 cicli. Tutti i valori di C_q per l'acido nucleico totale purificato da 100 µl di BAL sono risultati $\leq 29,93$ cicli, con un C_q medio di 29,74 cicli.

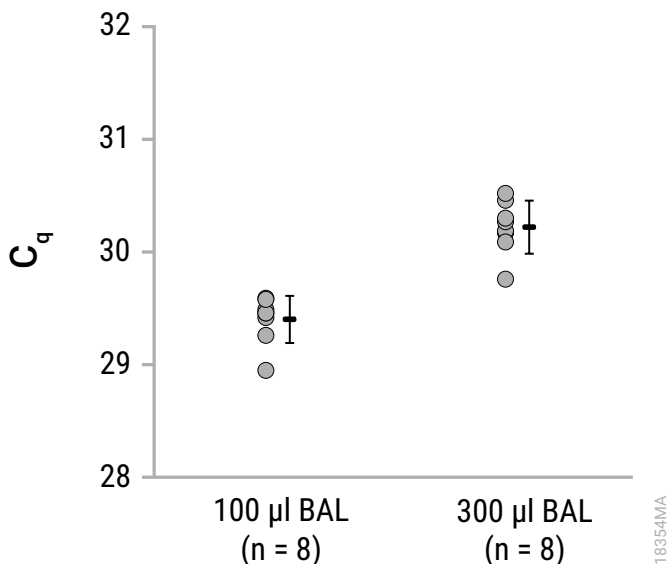


Figura 6. Amplificazione della sequenza target di RNA di SARS CoV-2 usando l'acido nucleico totale estratto da diversi volumi di campione immessi.

9.C. Riproducibilità

Per valutare la riproducibilità tra utenti dell'estrazione dell'acido nucleico totale usando il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit, tre utenti hanno pre-elaborato ognuno cinque replicati da 300 µl di mezzo di trasporto universale (UTM) arricchiti con *Bordetella pertussis* e hanno estratto l'acido nucleico totale nello stesso ciclo del Maxwell® CSC Instrument. Gli acidi nucleici sono stati eluiti usando 100 µl di tampone di eluizione. Cinque microlitri dell'eluato non diluito sono stati utilizzati in un'analisi della qPCR per amplificare la sequenza target di DNA specifica per *B. pertussis*, e sono stati calcolati il C_q medio e la deviazione standard. La purificazione dell'acido nucleico totale è risultata riproducibile, con deviazioni standard di 0,31 cicli (Utente 1), 0,23 cicli (Utente 2) e 0,40 cicli (Utente 3). La deviazione standard è di 0,32 cicli per tutti e tre gli utenti.

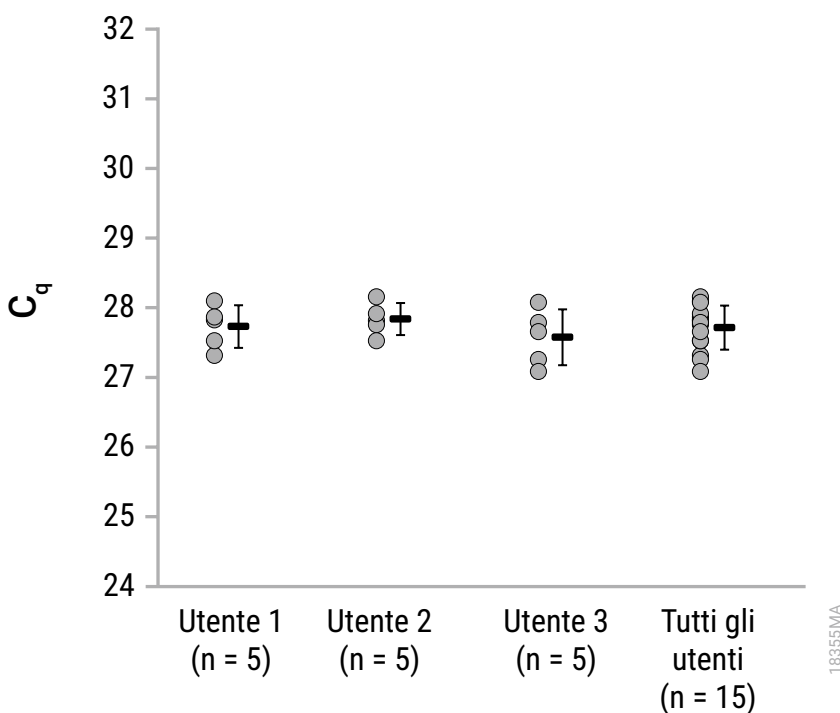


Figura 7. Riproducibilità dell'estrazione dell'acido nucleico totale tra tre utenti.

9.C. Riproducibilità (continua)

Per valutare la riproducibilità dell'estrazione dell'acido nucleico totale tra cicli di estrazione distinti, un singolo utente ha eseguito tre diversi cicli di estrazione dell'acido nucleico totale, ognuno con otto replicati da 300 µl di mezzo di trasporto universale arricchiti con *B. pertussis* utilizzando il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit con i Maxwell® CSC Instrument. L'acido nucleico totale è stato eluito usando 100 µl di tampone di eluizione in ognuno dei tre cicli distinti. Cinque microlitri dell'eluato non diluito sono stati utilizzati in un'analisi della qPCR per amplificare la sequenza target di DNA specifica per *B. pertussis*, e sono stati calcolati il C_q medio e la deviazione standard. La purificazione dell'acido nucleico totale è risultata riproducibile, con deviazioni standard di 0,25 cicli (Ciclo 1), 0,40 cicli (Ciclo 2) e 0,22 cicli (Ciclo 3). La deviazione standard è di 0,43 cicli per tutti e tre i cicli.

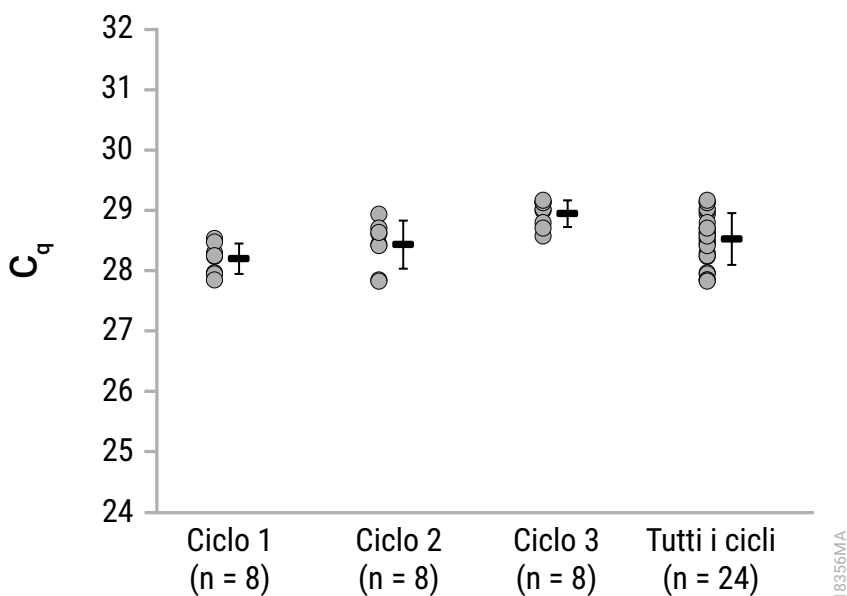


Figura 8. Riproducibilità dell'estrazione dell'acido nucleico totale tra tre cicli eseguiti da un singolo utente.

Per valutare la riproducibilità tra lotti dell'estrazione dell'acido nucleico totale usando il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit, l'acido nucleico totale è stato purificato da replicati da 300 µl di mezzo di trasporto universale arricchiti con *B. pertussis* utilizzando tre lotti di kit, ognuno contenente lotti unici di reagenti critici. Ogni eluito non diluito è stato utilizzato in un'analisi della qPCR per amplificare la sequenza target di DNA specifica per *B. pertussis*, e sono stati calcolati il C_q medio e la deviazione standard. La deviazione standard per i valori di C_q generati usando il Lotto 1 è pari a 0,38 cicli; per il Lotto 2 è pari a 0,30 cicli e per il Lotto 3 è pari a 0,35 cicli. La deviazione standard per C_q è di 0,34 cicli per tutti e tre i lotti.

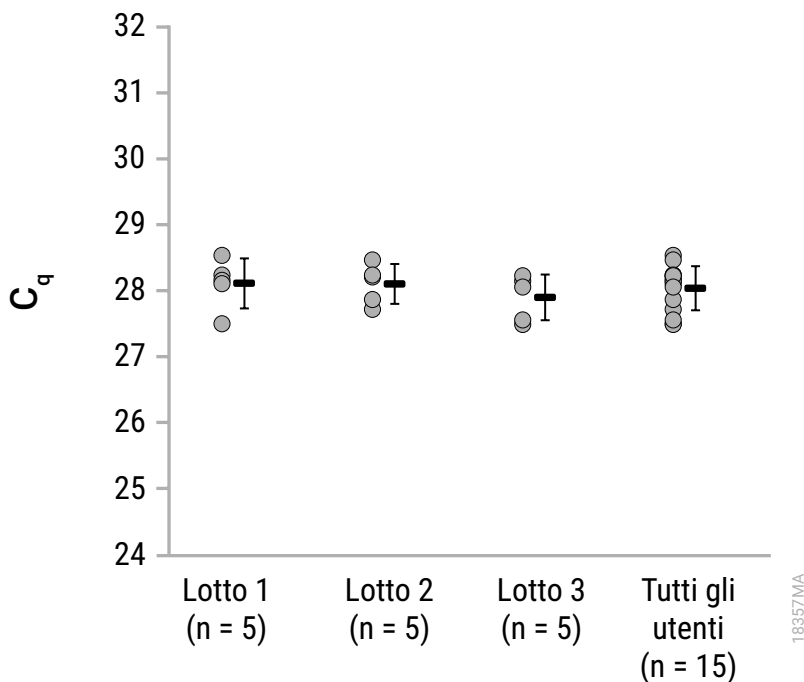


Figura 9. Riproducibilità dell'estrazione dell'acido nucleico totale tra tre lotti distinti del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.

9.D. Inibizione dell'amplificazione a causa di sostanze interferenti

Per valutare l'eventuale inibizione dell'amplificazione a causa di sostanze interferenti che vengono purificate in concomitanza con l'acido nucleico, l'acido nucleico totale è stato purificato da otto replicati da 300 µl di un campione di feci in sospensione arricchiti con 3×10^4 cellule di *Clostridium difficile* inattivato. Cinque microlitri di ogni eluito non diluito di acido nucleico totale e 5 µl di una diluizione di dieci volte di ogni eluito sono stati usati in un'analisi della qPCR per amplificare la sequenza target di DNA specifica per *C. difficile* per valutare l'effetto delle sostanze interferenti. Per il Maxwell® CSC Instrument, tutti i valori C_q per gli eluiti non diluiti sono risultati pari a $\leq 27,57$ cicli, con un C_q medio di 26,93 cicli. Per il Maxwell® CSC 48 Instrument, tutti i valori C_q per gli eluiti non diluiti sono risultati pari a $\leq 27,24$ cicli, con un C_q medio di 27,03 cicli. Sono stati confrontati i valori C_q degli eluiti non diluiti e degli eluiti con una diluizione di dieci volte per valutare l'inibizione nei singoli eluiti, con un ΔC_q previsto di $>2,5$ cicli, a indicare l'assenza di inibizione. L'intervallo ΔC_q degli eluiti non diluiti e degli eluiti con una diluizione di dieci volte per i campioni individuali è compreso tra 3,24 e 3,59, a indicare che eventuali sostanze interferenti presenti nell'eluito causano un'inibizione minima.

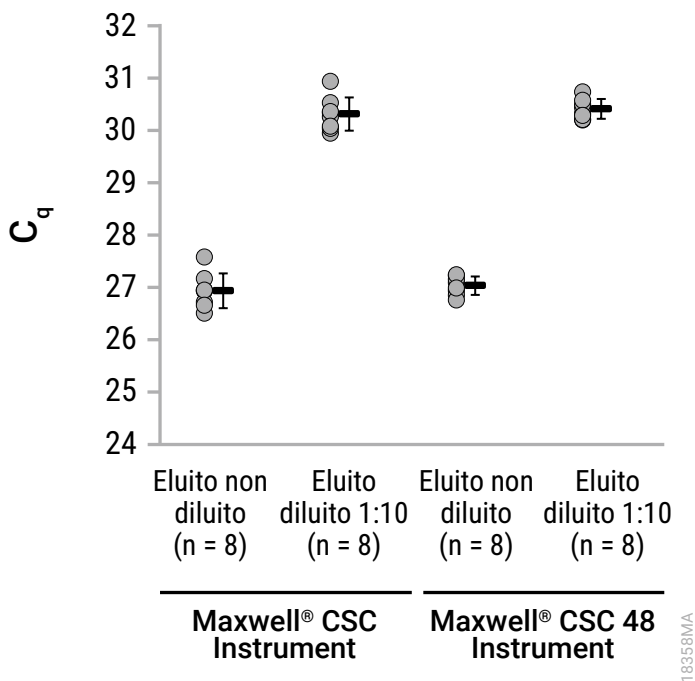


Figura 10. Valutazione dell'inibizione dell'amplificazione dell'acido nucleico totale estratto utilizzando il Maxwell® CSC o il Maxwell® CSC 48 Instrument.

L'acido nucleico totale è stato estratto da otto replicati da 300 µl di campioni di espettorato o di BAL arricchiti con 9×10^4 copie di *Chlamydia pneumoniae* inattivato ed eluito in 100 µl di tampone di eluizione. Cinque microlitri di ogni eluito non diluito di acido nucleico totale e 5 µl di una diluizione di dieci volte di ogni eluito sono stati usati in un'analisi della qPCR per amplificare la sequenza target di DNA specifica per *C. pneumoniae* per valutare l'effetto delle sostanze interferenti. Tutti i valori di C_q per gli eluiti non diluiti di acido nucleico totale di espettorato sono risultati $\leq 26,59$ cicli, con un C_q medio di 26,48 cicli. Il valore C_q medio per la diluizione di dieci volte di eluiti di acido nucleico totale da espettorato è risultato pari a 29,83 cicli, con una differenza tra i valori C_q medi per i campioni diluiti e non diluiti pari a 3,35 cicli. Tutti i valori di C_q per gli eluiti non diluiti di BAL sono risultati $\leq 26,64$ cicli, con un C_q medio di 26,41 cicli. Il valore C_q medio per la diluizione di dieci volte di eluiti di acido nucleico totale da BAL è risultato pari a 29,83 cicli, con una differenza di 3,42 cicli tra i valori C_q medi per i campioni diluiti e non diluiti, a indicare che eventuali sostanze interferenti presenti nell'eluito causano un'inibizione minima.

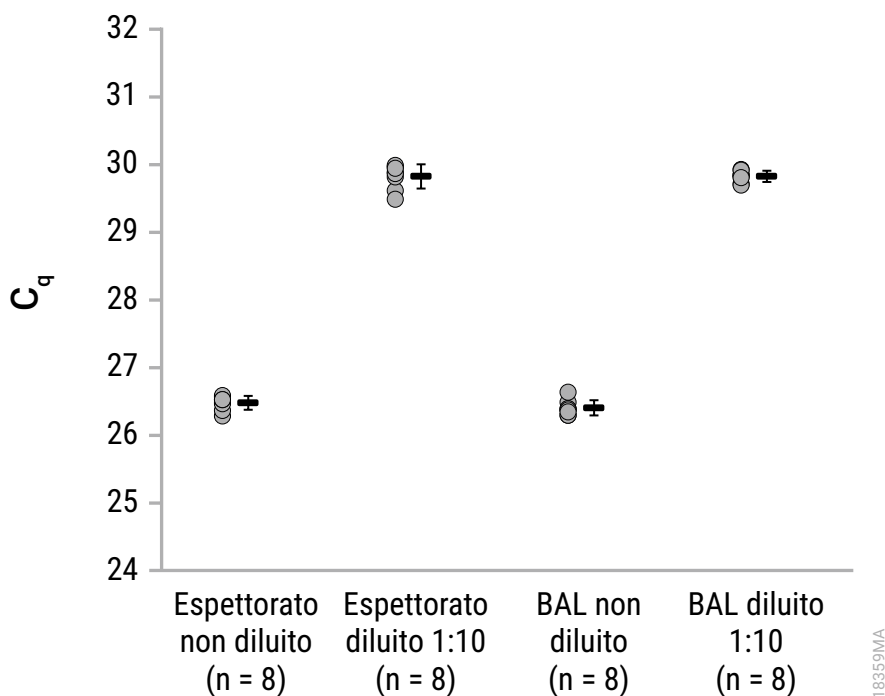


Figura 11. Valutazione dell'inibizione dell'amplificazione dell'acido nucleico totale estratto da campioni di espettorato e di BAL.

9.D. Inibizione dell'amplificazione a causa di sostanze interferenti (continua)

L'inibizione dell'amplificazione è stata valutata estraendo l'acido nucleico totale da campioni di mezzo di trasporto universale arricchiti con *B. pertussis* inattivato e amplificando il risultante acido nucleico totale mediante qPCR. In breve, l'acido nucleico totale è stato estratto da otto replicati da 300 µl di campioni di mezzo di trasporto universale arricchiti con circa 1×10^4 copie di *B. pertussis* inattivato ed eluiti in 100 µl di tampone di eluizione. Cinque microlitri di ogni eluito non diluito di acido nucleico totale e 5 µl di una diluizione di dieci volte di ogni eluito sono stati usati in un'analisi della qPCR per amplificare la sequenza target di DNA specifica per *B. pertussis* per valutare l'effetto delle sostanze interferenti. Il C_q medio per gli eluiti non diluiti ottenuti da campioni di mezzo di trasporto universale è risultato pari a 25,97 cicli. Il C_q medio per la diluizione di dieci volte degli eluiti è risultato pari a 29,49 cicli, con una differenza di 3,52 cicli tra i valori C_q medi per i campioni diluiti e non diluiti, a indicare che eventuali sostanze interferenti presenti nell'eluito causano un'inibizione minima.

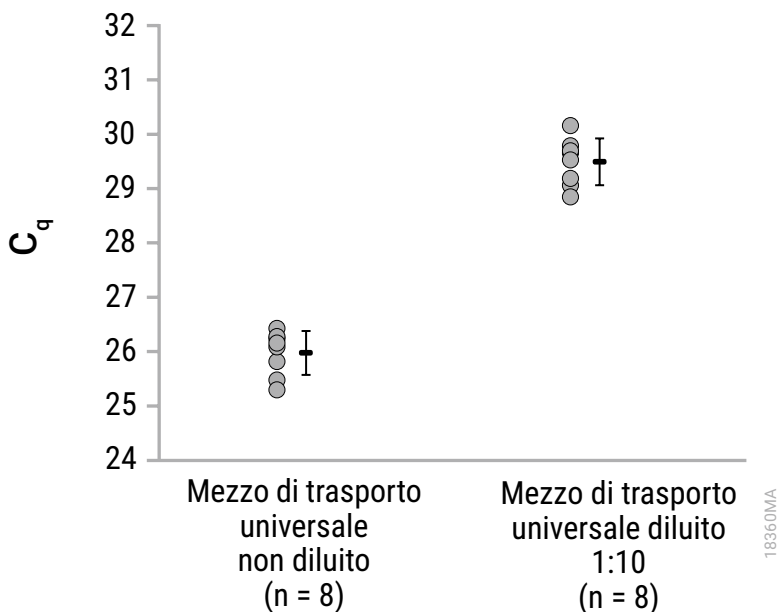


Figura 12. Valutazione dell'inibizione dell'amplificazione dell'acido nucleico totale estratto da campioni di mezzo di trasporto universale arricchiti con *B. pertussis*.

L'inibizione dell'amplificazione è stata valutata estraendo l'acido nucleico totale da campioni di mezzo di trasporto universale arricchiti con Herpes simplex virus 1 (HSV-1) inattivato. L'acido nucleico totale è stato estratto da otto replicati da 300 µl di campioni di mezzo di trasporto universale arricchiti con circa 1×10^5 copie di HSV-1 inattivato ed eluiti in 100 µl di tampone di eluizione. Cinque microlitri di ogni eluito non diluito di acido nucleico totale e 5 µl di una diluizione di dieci volte di ogni eluito sono stati usati in un'analisi della qPCR per amplificare la sequenza target di DNA specifica per HSV-1 per valutare l'effetto delle sostanze interferenti. Tutti i valori di C_q per gli eluiti non diluiti sono risultati $\leq 27,25$ cicli, con un C_q medio di 26,88 cicli. L'intervallo ΔC_q degli eluiti non diluiti e degli eluiti con una diluizione di dieci volte per i campioni individuali è compreso tra 3,44 e 3,91, a indicare che eventuali sostanze interferenti presenti nell'eluito causano un'inibizione minima.

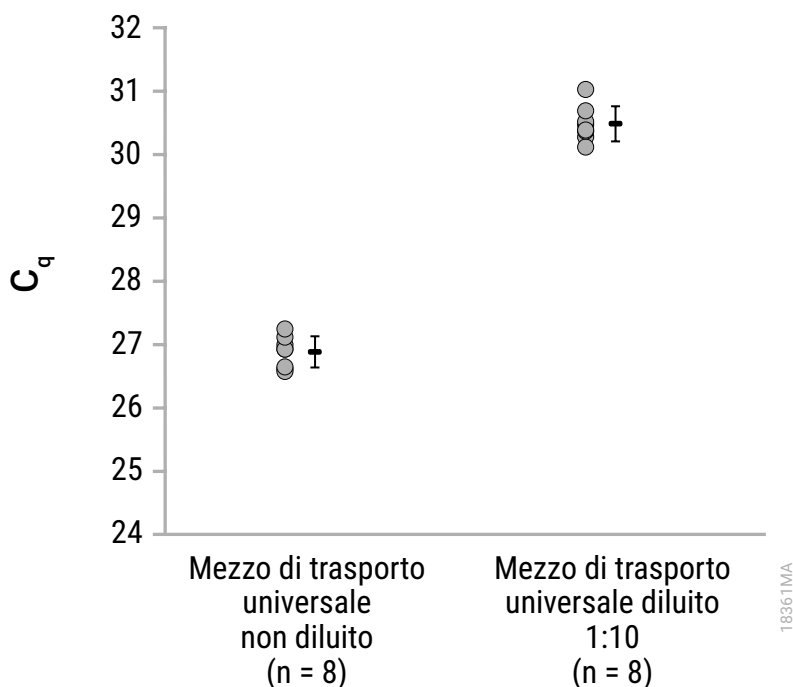


Figura 13. Valutazione dell'inibizione dell'amplificazione dell'acido nucleico totale estratto da campioni di mezzo di trasporto universale arricchiti con HSV-1.

9.E. Contaminazione crociata

La contaminazione crociata è stata valutata utilizzando il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit con il Maxwell® CSC Instrument alternando le Maxwell® CSC Cartridges contenenti campioni di mezzo di trasporto universale arricchiti con *B. pertussis* inattivato e campioni di mezzo di trasporto universale negativi non arricchiti con *B. pertussis* sul vassoio Maxwell® in un singolo ciclo di estrazione dell'acido nucleico totale. Gli eluiti provenienti dai campioni di mezzo di trasporto universale sia positivi che negativi a *B. pertussis* sono stati usati in un'analisi della qPCR per amplificare la sequenza target di DNA specifica per *B. pertussis*, e i valori C_q risultanti sono stati comparati a una curva standard (10^1 – 10^6 copie) generata utilizzando diluizioni seriali di DNA sintetico con la sequenza target di *B. pertussis*. Tutti gli eluiti di mezzo di trasporto universale arricchiti con *B. pertussis* avevano valori C_q all'interno della curva standard, con un C_q medio di 25,42 cicli. Tutti gli eluiti di mezzo di trasporto universale negativi non arricchiti con *B. pertussis* avevano valori C_q superiori al C_q ottenuto per la concentrazione più bassa di DNA della curva standard (10 copie).

10. Valutazione delle prestazioni cliniche

La valutazione delle prestazioni cliniche del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit è stata eseguita da un laboratorio clinico esterno utilizzando il Maxwell® CSC 48 Instrument per estrarre l'acido nucleico del patogeno dalle tipologie di campioni clinici elencate di seguito, e amplificando l'acido nucleico in un'analisi pertinente dal punto di vista clinico.

Tabella 2. Estrazione dell'acido nucleico totale di *Clostridium difficile* da campioni di feci. L'acido nucleico totale è stato estratto da un tester da ciascuno di dieci campioni di feci umane da 200 mg positivi a *Clostridium difficile* (*C. difficile*) e dieci negativi a *C. difficile* utilizzando il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. L'acido nucleico è stato inoltre purificato da questi campioni utilizzando il metodo di purificazione standard del laboratorio come riferimento. Gli eluiti risultanti sono stati analizzati amplificando i target di DNA della tossina A e della tossina B di *C. difficile* in un'analisi della qPCR. L'acido nucleico estratto da tutti i campioni presunti negativi al *C. difficile* e presunti positivi al *C. difficile* purificati con il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit ha riportato i risultati previsti e ha mostrato concordanza con i risultati ottenuti dall'acido nucleico estratto con il metodo di estrazione di riferimento del laboratorio.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Metodo di riferimento del laboratorio
Campioni negativi al <i>C. difficile</i> concordanti	10/10	10/10
Campioni positivi al <i>C. difficile</i> concordanti	10/10	10/10

Tabella 3. Estrazione dell'acido nucleico totale di citomegalovirus da campioni di lavaggio broncoalveolare (BAL).

L'acido nucleico totale è stato estratto da un tester da dieci campioni di BAL umano positivi al citomegalovirus (CMV) (100 µl e 300 µl) e dieci negativi al CMV (300 µl) utilizzando il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Inoltre, l'acido nucleico totale è stato estratto dai medesimi dieci campioni di BAL da 300 µl positivi al CMV e dai dieci negativi al CMV utilizzando il metodo di purificazione standard del laboratorio come riferimento. Gli eluiti risultanti sono stati analizzati amplificando la sequenza target principale di DNA dei geni primitivi immediati di CMV in un'analisi della qPCR. L'acido nucleico estratto da tutti i campioni presunti negativi al CMV e presunti positivi al CMV (entrambi da 100 µl e 300 µl) purificati con il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit ha riportato i risultati previsti e ha mostrato concordanza con i risultati ottenuti dall'acido nucleico estratto con il metodo di estrazione di riferimento del laboratorio.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Metodo di riferimento del laboratorio
Campioni negativi al CMV concordanti	10/10 per un volume impresso di 300 µl	10/10 per un volume impresso di 300 µl
Campioni positivi al CMV concordanti	10/10 per un volume impresso di 100 µl 10/10 per un volume impresso di 300 µl	10/10 per un volume impresso di 300 µl

Tabella 4. Estrazione dell'acido nucleico totale di SARS-CoV-2 da campioni di mezzo di trasporto virale (VTM).

Due tester hanno estratto l'acido nucleico totale da 300 µl di mezzo di trasporto virale che conteneva un campione di tampone nasofaringeo. L'acido nucleico totale è stato estratto da dieci campioni di mezzo di trasporto virale umano positivi al SARS CoV-2 e dieci negativi al SARS CoV-2 da due tester utilizzando il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Un tester ha inoltre estratto acido nucleico dagli stessi campioni utilizzando il metodo di purificazione standard del laboratorio come riferimento. Gli eluiti risultanti sono stati analizzati amplificando il RdRP e i geni N dal SARS CoV-2 in un'analisi della RT-qPCR. L'acido nucleico estratto da tutti i campioni negativi al SARS CoV-2 e positivi al SARS CoV-2 purificati da entrambi i tester con il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit ha riportato i risultati previsti e ha mostrato concordanza con i risultati ottenuti dall'acido nucleico estratto con il metodo di estrazione di riferimento del laboratorio.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Metodo di riferimento del laboratorio
Campioni negativi al SARS-CoV-2 concordanti	10/10 per Tester A 10/10 per Tester B	10/10
Campioni positivi al SARS-CoV-2 concordanti	10/10 per Tester A 10/10 per Tester B	10/10

10. Valutazione delle prestazioni cliniche (continua)

Tabella 5. Estrazione di acido nucleico totale di papillomavirus umano da campioni di mezzo di trasporto per Pap test.

Un tester ha estratto l'acido nucleico totale da 300 µl di campioni di mezzo di trasporto per Pap test ThinPrep® che contenevano tamponi cervicali raccolti da pazienti umani. L'acido nucleico totale è stato estratto da nove campioni di mezzo di trasporto per Pap test positivi al papilloma virus umano (HPV) e nove negativi all'HPV utilizzando il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. L'acido nucleico è stato inoltre estratto da questi campioni utilizzando il metodo di purificazione standard del laboratorio come riferimento. Gli eluiti risultanti sono stati analizzati amplificando i target di DNA di HPV-16, di HPV-18 e di HPV ad alto rischio in un'analisi della qPCR. L'acido nucleico estratto da tutti i campioni positivi all'HPV estratto con il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit ha riportato i risultati previsti e ha mostrato concordanza con i risultati ottenuti dall'acido nucleico estratto con il metodo di estrazione di riferimento del laboratorio.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Metodo di riferimento del laboratorio
Campioni negativi all'HPV concordanti	9/9	9/9
Campioni positivi all'HPV concordanti	9/9	9/9

Tabella 6. Estrazione dell'acido nucleico totale di citomegalovirus da campioni di urina. L'acido nucleico totale è stato estratto da un tester da ciascuno di dieci campioni di urina umana da 300 µl positivi al CMV e dieci negativi al CMV utilizzando il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. L'acido nucleico è stato inoltre estratto da questi campioni utilizzando il metodo di purificazione standard del laboratorio come riferimento. Gli eluiti risultanti sono stati analizzati amplificando la sequenza target principale di DNA dei geni primitivi immediati di CMV in un'analisi della qPCR. Tutti i campioni di urina umana negativi al CMV e nove dei dieci campioni positivi al CMV hanno mostrato concordanza con i risultati ottenuti dall'acido nucleico estratto con il metodo di estrazione di riferimento del laboratorio. Uno dei campioni di urina presunti positivi al CMV è risultato discordante tra i due metodi di purificazione, riportando un risultato negativo con il sistema di purificazione Maxwell® CSC e un risultato debolmente positivo (il C_q inferiore, pari a 36,26, tra i quattro replicati con un risultato positivo su un totale di cinque replicati testati) con il metodo di estrazione di riferimento del laboratorio.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Metodo di riferimento del laboratorio
Campioni negativi al CMV concordanti	10/10	10/10
Campioni positivi al CMV concordanti	9/10	10/10

Tabella 7. Estrazione dell'acido nucleico totale di citomegalovirus da campioni di plasma. L'acido nucleico totale è stato estratto da un tester da ciascuno di dieci campioni di plasma umano da 300 µl positivi a CMV e dieci negativi a CMV utilizzando il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. L'acido nucleico è stato inoltre estratto da questi campioni utilizzando il metodo di purificazione standard del laboratorio come riferimento. Gli eluiti risultanti sono stati analizzati mediante l'amplificazione la sequenza target principale di DNA dei geni precoci immediati del CMV in un'analisi della qPCR. L'acido nucleico estratto da tutti i campioni di plasma umano negativi al CMV e positivi al CMV purificati con il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit ha riportato i risultati previsti e ha mostrato concordanza con i risultati ottenuti dall'acido nucleico estratto con il metodo di estrazione di riferimento del laboratorio.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Metodo di riferimento del laboratorio
Campioni negativi al CMV concordanti	10/10	10/10
Campioni positivi al CMV concordanti	10/10	10/10

La contaminazione crociata che si verifica nell'ambiente di utilizzo previsto per gli utenti utilizzando il Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit è stata valutata alternando le Maxwell® CSC Cartridges contenenti campioni di plasma umano positivi al CMV e negativi al CMV sul vassoio del Maxwell® CSC 48 Instrument in un singolo ciclo di estrazione dell'acido nucleico totale. Non è stata osservata alcuna contaminazione crociata, dato che i campioni negativi hanno riportato un risultato negativo a una sequenza target di DNA di CMV in un'analisi della qPCR.

11. Creazione di un ambiente privo di ribonucleasi

È estremamente difficile disattivare le ribonucleasi. Assicurarsi di evitare di introdurre attività di RNasi nei campioni di acido nucleico totale che contengono RNA durante e dopo l'isolamento. Ciò è particolarmente importante se il materiale di partenza è stato difficile da ottenere o non è reintegrabile. Le note seguenti possono aiutare ad evitare una contaminazione accidentale dei campioni con RNasi.

1. Due delle più frequenti fonti di contaminazione con RNasi sono le mani dell'utilizzatore e i batteri o le muffe che possono essere presenti in particelle di polvere trasportate dall'aria. Per evitare la contaminazione da tali fonti, utilizzare tecniche sterili nel maneggiare i reagenti forniti con questo sistema. Indossare sempre i guanti. Cambiare i guanti ogni volta che si possa aver toccato ribonucleasi.
2. Quando possibile, usare oggetti in plastica usa e getta sterili per maneggiare acidi nucleici totali che contengono RNA. Questi materiali sono generalmente privi di RNasi e non richiedono pretrattamenti di disattivazione delle RNasi.
3. Trattare prima dell'utilizzo oggetti in vetro e in plastica e camere di elettroforesi non sterili per assicurarsi che siano privi di RNasi. Porre gli oggetti in vetro in forno a 200°C per la notte e sciacquare accuratamente le plastiche con NaOH 0,1 N, EDTA 1 mM, quindi con acqua priva di RNasi. Possono anche essere impiegati prodotti di rimozione delle RNasi commercialmente disponibili, seguendo le istruzioni del fabbricante.

Nota: le camere di elettroforesi possono essere contaminate con ribonucleasi (in particolare con RNasi A) originate dai campioni di DNA. Quando possibile, dedicare un apparato nuovo o decontaminato alla sola analisi dell'RNA.

4. Trattare le soluzioni non a corredo del sistema aggiungendo DEPC (dietil pirocarbonato) a 0,1% v/v in una cappa chimica. Incubare tutta la notte agitando a temperatura ambiente nella cappa chimica. Autoclavare per 30 minuti per rimuovere qualunque residuo di DEPC.



Attenzione: DEPC è un possibile cancerogeno e deve essere usato solo in una cappa chimica. DEPC reagisce rapidamente con le amine e non può essere utilizzato per trattare i tamponi Tris.

Nota: per tutte le applicazioni a valle, è essenziale continuare a proteggere i campioni di RNA dalle RNasi. Indossare guanti puliti e usare soluzioni e provette da centrifuga prive di RNasi.

12. Bibliografia

1. Clinical Laboratory Standards Institute (2020) CLSI MM13–Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods. Second Edition.
2. Baron, E.J. (2015) Specimen collection, transport, and processing: Bacteriology. In: *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition*, edited by Jorgensen, J.H. et al. 270–315. Washington, D.C., ASM Press.
3. Centers for Disease Control and Prevention. *Interim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Specimens for COVID-19 Testing*. Consultato il 2 novembre 2022: www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html
4. Centers for Disease Control and Prevention. *Stool Specimens - Molecular Diagnosis*. Consultato il 2 novembre 2022: www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/stool/moleculardx.html

13. 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
Recupero di acido nucleico del patogeno inferiore al previsto (p. es., per i controlli interni forniti dal cliente)	I campioni iniziali erano compromessi. Assicurarsi che i campioni siano stati prelevati, spediti e conservati secondo le linee guida raccomandate. Per i campioni di RNA virale, assicurarsi di aver usato condizioni prive di RNasi per la preparazione del campione e nell'impostazione dell'analisi, incluse provette e puntali privi di RNasi. Il passaggio di elaborazione non è stato ottimale. • Usare esclusivamente il tampone di lisi fornito con il presente kit. • Una miscelazione incompleta potrebbe ridurre la lisi. Mescolare il campione tramite agitatore con la soluzione di lisi secondo quanto raccomandato. • Trattamento della proteasi incompleto per rimuovere i capsidi virali e/o le proteine da batteri e parassiti. Verificare la temperatura del blocco termostato o del bagnetto e incubare per tutto il tempo raccomandato. • In caso di patogeni difficili da lisare (batteri gram-positivi o parassiti) nei campioni di feci, è possibile eseguire l'ulteriore passaggio di macinazione tramite perline. • Assicurarsi di aver aggiunto il 1-tioglicerolo durante la pre-elaborazione dei campioni di BAL o di espettorato. L'omissione del 1-tioglicerolo potrebbe avere un effetto negativo sulle rese. • L'aggiunta di una quantità superiore di campione rispetto a quella raccomandata potrebbe ridurre il recupero degli acidi nucleici. Verificare che lo stantuffo sia stato aggiunto alla cartuccia. Problemi di conservazione post-purificazione. • Rimuovere gli eluiti e conservarli alla temperatura raccomandata immediatamente dopo il ciclo del Maxwell® Instrument. • Non sottoporre gli eluiti a più cicli di congelamento-scongelo prima delle analisi a valle. Il sistema potrebbe non essere in grado di purificare correttamente alcuni controlli interni degli acidi nucleici inferiori ai 100 bp. L'utilizzatore è responsabile di stabilire le prestazioni di ciascun controllo interno.

13. Risoluzione dei problemi (continua)

Problema	Cause e commenti
Scarsa amplificazione	Il carryover delle particelle paramagnetiche può causare un'interferenza nella reazione di amplificazione. Rimuovere le particelle nella provetta di eluizione tramite centrifugazione o separazione magnetica. Aggiunta del tampone di eluizione errato. Utilizzare esclusivamente il tampone di eluizione in dotazione al Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.
Contaminazione crociata	Usare puntali nuovi per ciascun campione per evitare la contaminazione tra campioni. Evitare le fuoriuscite quando si aggiungono i lisati alle cartucce. Le cartucce possono essere rimosse dal vassoio per l'aggiunta del campione per ridurre al minimo la contaminazione delle cartucce adiacenti.
Non è possibile prelevare gli stantuffi con lo strumento	Assicurarsi di utilizzare un kit di prodotti chimici specifici per il Maxwell® CSC; gli stantuffi dei kit reagente Maxwell® CSC sono specifici per i Maxwell® Instrument supportati da questo kit.

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.

14. Prodotti correlati

Strumento e accessori

Prodotto	Quantità	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument	1 cadauno	AS6000
Maxwell® CSC 48 Instrument	1 cadauno	AS8000
Maxwell® RSC/CSC Plungers, 50/conf	1 cadauno	AS1331
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 cadauno	SP6019
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 cadauno	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 cadauno	AS8402
ClickFit Microtube, 1,5 ml	1.000/conf.	V4741

Kit di reagenti Maxwell® CSC

Visitare www.promega.com per l'elenco dei Maxwell® CSC purification kit disponibili.

^(a)Brevetti USA n. 7.329.488 e Sud Corea n. 100483684.

© 2022 Promega Corporation. Tutti i diritti riservati.

Maxwell è un marchio registrato di Promega Corporation.

ThinPrep è un marchio registrato di Hologic, Inc.

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.