

INSTRUKCJA TECHNICZNA

Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Instrukcja użytkowania produktu
AS1860

Przestroga: Z kartridżami należy obchodzić się ostrożnie; krawędzie zamknięcia kartridża mogą być ostre.



INSTRUKCJA
UŻYTKOWANIA PRODUKTU
AS1860



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanower, Niemcy



Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Dokumentacja techniczna jest dostępna na stronie internetowej pod adresem: www.promega.com/protocols/
 Na tej stronie internetowej można sprawdzić, czy używana wersja niniejszej instrukcji technicznej jest aktualna.
 W razie pytań dotyczących obsługi tego systemu prosimy o kontakt z działem Promega Technical Services pod adresem:
techserv@promega.com.

1. Opis	2
2. Elementy produktu i warunki przechowywania	3
3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu.....	5
4. Ograniczenia stosowania produktu	5
5. Przed rozpoczęciem	6
6. Przygotowanie próbek	7
6.A. Przygotowywanie próbek kału do użycia z zestawem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	7
6.B. Przygotowywanie próbek BAL lub próbek płwociny do użycia z zestawem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.....	8
6.C. Przygotowywanie próbek moczu do użycia z zestawem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	9
6.D. Przygotowywanie próbek osocza, próbek wirusowego podłoża transportowego lub próbek podłoża Pap do użycia z zestawem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	10
6.E. Przygotowywanie kartridża Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge	10
7. Konfiguracja i uruchamianie urządzenia Maxwell®	12
8. Przechowywanie eluowanego kwasu nukleinowego	14
9. Ocena wydajności analitycznej.....	15
9.A. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji DNA	15
9.B. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji RNA	16
9.C. Odtwarzalność.....	18
9.D. Inhibicja amplifikacji ze względu na substancje zakłócające	21
9.E. Zanieczyszczenie krzyżowe	25
10. Ocena wydajności klinicznej	25
11. Tworzenie środowiska wolnego od rybonukleaz	29
12. Źródła.....	29
13. Rozwiązywanie problemów	30
14. Powiązane produkty	32

Zestaw Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit jest dostępny wyłącznie w niektórych krajach.

1. Opis

Zestaw Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit^(a) jest używany wraz z urządzeniami Maxwell® określonymi w Tabeli 1 i służy do zapewniania łatwej metody wydajnego, zautomatyzowanego przygotowywania próbek i oczyszczania całkowitego kwasu nukleinowego patogenu. Urządzenia Maxwell® CSC Instrument są przeznaczone do stosowania ze wstępnie napełnionymi kartridżami z odczynnikami i wstępnie zaprogramowanymi procedurami oczyszczania, co zwiększa wygodę i upraszcza stosowanie. Zestaw Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit opracowano z myślą o zautomatyzowanej ekstrakcji bakteryjnego, wirusowego i pasożytniczego całkowitego kwasu nukleinowego z poniższych ludzkich próbek biologicznych: kał, płwocina, płukanie oskrzelowo-płucne, mocz, osocze, wymazy z nosogardzieli i wymazy z szyjki macicy na podłożu transportowym. Metoda Maxwell® Instrument dla zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit może przetworzyć od jednej do maksymalnej liczby próbek w aparacie Maxwell® Instrument w około 40 minut. Niska objętość elucji wynosząca 100 µl skutkuje uzyskaniem stężonego, oczyszczonego kwasu nukleinowego do dalszych zastosowań, takich jak ilościowa metoda PCR (qPCR) lub ilościowa metoda RT-PCR (RT-qPCR). Po zakończeniu krótkiej lizy w ramach wstępnego przetwarzania próbka jest dodawana do kartridża Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge, a pozostały etap przetwarzania jest w pełni zautomatyzowany.

Tabela 1. Kompatybilność z urządzeniami.

Urządzenie	Cat.#	Instrukcja techniczna
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

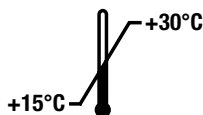
Podstawy metody

Zestaw Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit umożliwia oczyszczanie próbek przy użyciu cząsteczek paramagnetycznych, które zapewniają ruchomą fazę stałą stwarzającą optymalne warunki do wychwytywania próbki oraz przemycania i oczyszczania kwasu nukleinowego. Urządzenia Maxwell® są urządzeniami przeprowadzającymi analizy w oparciu o cząsteczki magnetyczne, które wiążą kwasy nukleinowe do cząsteczek paramagnetycznych w pierwszym dołku wstępnie napełnionego kartridża. Próbkę są przetwarzane w ramach cykli płukania, zanim kwas nukleinowy całkowicie zostanie eluowany.

2. Elementy produktu i warunki przechowywania

PRODUKT	ILOŚĆ	CAT.#
Zestaw Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	48 preparatów	AS1860

Do stosowania w diagnostyce in vitro. Wyłącznie do użytku przez specjalistów. Wystarczy do 48 izolacji. Kartridże są przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku.



Zawartość zestawu:

- 150 ml buforu do rozcieńczania (ST1)
- 900 µl 1-tioglicerolu
- 20 ml buforu lizującego
- 2 × 1 ml roztworu proteinazy K (PK)
- 50 tłoczków CSC/RSC
- 48 kartridży Maxwell® CSC Cartridge (CSCQ)
- 50 probówek do elucji (0,5 ml)
- 20 ml buforu do elucji

Warunki przechowywania: Po otrzymaniu wyjąć 1-tioglicerol i przechowywać w temperaturze od +2°C do +10°C. Pozostałe elementy zestawu przechowywać w temperaturze pokojowej (od +15°C do +30°C).



Informacje dotyczące bezpieczeństwa: Kartridże zawierają etanol, izopropanol i chlorowodorek guanidyny. Etanol i izopropanol należy traktować jako substancje łatwopalne, szkodliwe i drażniące. Chlorowodorek guanidyny należy traktować jako substancję toksyczną, szkodliwą i drażniącą. Więcej informacji na temat bezpieczeństwa znajduje się w karcie SDS.



Kartridże są przeznaczone do stosowania z czynnikami potencjalnie zakaźnymi. Podczas pracy z czynnikami zakaźnymi należy nosić odpowiednie środki ochrony (np. rękawiczki i okulary ochronne). Należy przestrzegać obowiązujących w instytucji wytycznych dotyczących postępowania ze wszystkimi czynnikami zakaźnymi używanymi z tym systemem oraz utylizacji takich czynników.

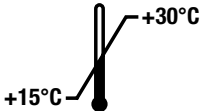


Przestroga: Z kartridżami należy obchodzić się ostrożnie; krawędzie mogą być ostre.

Informacje dodatkowe: Elementy zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit zostały dopuszczone do łącznego stosowania na podstawie odpowiednich procedur kwalifikacyjnych i testów kontroli jakości. **Nie** mieszać elementów zestawu z elementami zestawów różnych serii. Należy używać wyłącznie elementów dostarczonych w zestawie. Nie używać kartridży, jeśli zamknięcie na kartridżu było naruszone w momencie dostawy. Dodatkowe informacje dotyczące bezpieczeństwa znajdują się w karcie charakterystyki dostępnej na stronie: **www.promega.com**

2. Elementy produktu i warunki przechowywania (ciąg dalszy)

Objaśnienie symboli

Symbol	Objaśnienie	Symbol	Objaśnienie
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Nie używać ponownie
	Przechowywać w temperaturze od +15°C do +30°C.		Wytwórca
	Przeostroga		Łatwopalny
	Zagrożenie dla zdrowia		Zawiera ilość wystarczającą do przeprowadzenia „n” badań
	Ostrzeżenie. Niebezpieczeństwo zmiążdżenia.		Ostrzeżenie. Zagrożenie biologiczne.
	Numer partii		Numer katalogowy
	Conformité Européenne		Autoryzowany przedstawiciel

3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu

Zestaw Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit jest przeznaczony do użytkowania, w połączeniu z urządzeniami Maxwell® CSC Instrument i metodą Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Method jako wyrób medyczny do diagnostyki in vitro (IVD) w celu automatycznego wyizolowania wirusowego, bakteryjnego i/lub pasożytniczego całkowitego kwasu nukleinowego z poniższych typów ludzkich próbek: kał, płwocina, płukanie oskrzelowo-płucne, wymazy z nosogardzieli na podłożu transportowym i wymazy z szyjki macicy na podłożu transportowym, mocz i osocze. Oczyszczony całkowity kwas nukleinowy nadaje się do stosowania w analizach wykonywanych na potrzeby diagnostyki in vitro opartych na amplifikacji.

Zestaw Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit jest przeznaczony do stosowania w temperaturze od 15°C do 30°C. Stosowanie zestawu poza tym zakresem temperatur może prowadzić do uzyskania nieprawidłowych wyników.

Zestaw Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit jest przeznaczony wyłącznie do użytku przez specjalistów. Wyniki diagnostyczne uzyskane na podstawie całkowitego kwasu nukleinowego oczyszczonego za pomocą tego systemu należy interpretować w połączeniu z innymi danymi klinicznymi lub laboratoryjnymi.

4. Ograniczenia stosowania produktu

Wydajność zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit oceniono pod kątem poniższych patogenów za pomocą wymienionych typów próbek:

- Bakterie: kał, płwocina, płukanie oskrzelowo-płucne, wymazy z nosogardzieli na podłożu transportowym i wymazy z szyjki macicy na podłożu transportowym, mocz.
- Pasożyty: kał, wymazy z szyjki macicy na podłożu transportowym, mocz.
- Wirusy: kał, płwocina, płukanie oskrzelowo-płucne, wymazy z nosogardzieli na podłożu transportowym i wymazy z szyjki macicy na podłożu transportowym, mocz, osocze.

Zestaw Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit nie jest przeznaczony do użytkowania wraz z próbkami innymi niż ludzkie.

W przypadku dalszych zastosowań diagnostycznych wykorzystujących kwas nukleinowy oczyszczony za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit należy stosować odpowiednie środki kontrolne. Użytkownik jest odpowiedzialny za weryfikację charakterystyki wydajności wymaganej do dalszych zastosowań diagnostycznych.

5. Przed rozpoczęciem

Materiały zapewniające przez użytkownika

- probówki o pojemności 1,5–2,0 ml do inkubacji próbek (np. ClickFit Microtube, 1,5 ml [Cat.# V4741]; zalecane w celu zapobiegnięcia otwarcia zatyczki podczas ogrzewania)
- probówka stożkowa o pojemności 15 ml lub 50 ml do przygotowania roztworu lizującego
- wytrząsarka typu vortex
- pipetory i końcówki pipet do przenoszenia próbek do wstępnie napełnionych kartridży z odczynnikami
- blok grzewczy lub łaźnia wodna ustawiona na temperaturę 56°C
- blok grzewczy ustawiony na 95°C na potrzeby próbek płwociny i próbek z płukania oskrzelowo-płucne
- **opcjonalnie:** roztwór PBS 1X do rozcieńczenia próbek BAL i płwociny
- **opcjonalnie:** odwirowywać na potrzeby wstępnego przetwarzania próbki moczu
- **opcjonalnie:** kulki cyrkonowe 0,1–0,5 mm do wstępnego przetwarzania próbek kału (np., kulki do rozdrabniania ZR, Zymo [Cat. #S6012-50])
- probówki na próbki kału, płwociny, z płukania oskrzelowo-płucnego (BAL), wirusowego podłoża transportowego (VTM), podłoża Pap, osocza i moczu



Podczas obchodzenia się z próbkami ludzkimi zaleca się podjęcie odpowiednich środków ostrożności w zakresie patogenów krwiopochodnych.

W przypadku próbek osocza pobrać krew do probówek EDTA z antykoagulantem. Unikać stosowania probówek do pobierania krwi zawierających heparynę, ponieważ heparyna może powstrzymywać amplifikację na dalszych etapach.

Poniżej przedstawiono ogólne zalecenia dotyczące przygotowywania i przechowywania próbek (1–4):

1. Oddzielić osocze od komórek w ciągu 1 godziny od pobrania krwi poprzez wirowanie z szybkością 1500 × g przez 20 minut w temperaturze 25°C i przeniesienie warstwy osocza do czystej probówki. Przechowywać próbki osocza w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 24 godziny lub zamrozić próbki, które nie zostaną przetworzone w ciągu 24 godzin w temperaturze –20°C na maksymalnie 5 dni.
2. W przypadku wymazów w VTM należy używać wyłącznie patyczków z syntetycznymi włóknami i plastikowymi trzonkami. Nie używać patyczków z alginianu wapnia ani patyczków z drewnianymi trzonkami, ponieważ mogą one zawierać substancje, które utrudniają testowanie PCR. Natychmiast umieścić patyczki w sterylnych probówkach zawierających 2–3 ml wirusowego nośnika transportowego. Przechowywać podłoże VTM i próbki w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 72 godziny lub zamrozić próbki w temperaturze –70°C. Unikać zamrażania i rozmrażania próbek. Nie wolno przechowywać próbek w zamrażarce bezszronowej. Określone warunki pobierania i przechowywania mogą się różnić, w zależności od rodzaju izolowanego wirusa.
3. Przechowywać świeże próbki moczu w temperaturze 4°C przez maksymalnie 24 godziny przed przetwarzaniem. W przypadku długoterminowego przechowywania dodać EDTA do końcowego stężenia wynoszącego 20 mM. Aby uniknąć lizy komórek, przechowywać próbkę ustabilizowanego moczu w temperaturze 4°C. Aby uniknąć lizy komórek, nie wolno zamrażać moczu. Jeśli moczu zostanie zamrożony i rozmrożony, osad może stać się widoczny. Mieszanie i/lub podgrzewanie próbki powinno rozpuścić osad. Unikać odwirowywania próbki w celu usunięcia osadu, ponieważ może to spowodować usunięcie nienaruszonych komórek patogennych.

4. Przechowywać próbki BAL i próbki płwociny w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 72 godziny lub zamrozić próbki w temperaturze –70°C. Unikać zamrażania i rozmrażania próbek. Nie wolno przechowywać próbek w zamrażarce bezszronowej. Określone warunki pobierania i przechowywania mogą się różnić, w zależności od rodzaju izolowanego patogenu.
5. Próbkę kału powinny być zamrożone w temperaturze od –20°C do –80°C przed przetwarzaniem.

6. Przygotowanie próbek

6.A. Przygotowywanie próbek kału do użycia z zestawem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

1. Odważyć 100–500 mg próbki kału do zamykanej probówki mikrowirówkowej o pojemności z 2 ml.
2. Dodać 1 ml buforu do rozcieńczania (ST1), aby ponownie zawiesić próbkę. Energicznie wytrząsać przez okres od 30 sekund do 1 minuty. Używać świeżych końcówek pipet do każdej próbki, aby zapobiec zanieczyszczeniu między próbkami.
3. Odwirowywać próbkę z szybkością 1000 × g przez 1 minutę w temperaturze pokojowej.
4. Przenieść supernatant do probówki o odpowiednim rozmiarze i zmierzyć objętość.
5. Dodać objętość 2X buforu do rozcieńczania (ST1) na potrzeby rozcieńczania w stosunku 1:2 próbki kału [np. 1 ml supernatantu kału + 2 ml buforu do rozcieńczania (ST1)]. Użyć tego rozcieńczenia próbki kału na potrzeby oczyszczenia DNA.

Uwaga: na potrzeby ekstrakcji wirusowego RNA przeprowadzić dalsze rozcieńczanie próbki kału w stosunku 1:8 w wodzie wolnej od nukleaz (np. 100 µl rozcieńczenia próbki kału w stosunku 1:2 + 700 µl wody wolnej od nukleaz). Przechowywać próbkę w temperaturze pokojowej, aż będzie gotowa do przetwarzania.

Opcjonalna metoda rozdrabniania kulkami ceramicznymi na potrzeby ekstrakcji DNA z patogenów utrudniających lizę w próbkach kału

Uwaga: na potrzeby ekstrakcji kwasów nukleinowych z patogenów utrudniających lizę, takich jak bakterie Gram-dodatnie lub pierwotniak w próbkach kału, można wykonać opcjonalny krok rozdrabniania kulkami ceramicznymi. Ta dodatkowa homogenizacja może zwiększyć uzysk w zakresie oczyszczania kwasu nukleinowego, jeśli standardowa metoda lizy jest niewystarczająca.

- a. Przenieść od 600 µl do 1 ml rozcieńczonej próbki kału do probówki o pojemności 2 ml zawierającej kulki i zamknąć probówkę.
- b. Umieścić probówkę na wytrząsarce do płytek lub jej odpowiedniku i wytrząsać lub rozdrabniać kulkami ceramicznymi z maksymalną szybkością przez 10 minut.
- c. Odwirowywać probówki w mikrowirówce przez 1 minutę z pełną szybkością, aby oddzielić kulki od próbek.
6. Dodać 300 µl lizatu kału do nowej probówki o pojemności 1,5 ml.
7. Dodać 300 µl buforu lizującego i mieszać na mieszadle typu vortex przez 10 sekund.
8. Dodać 30 µl roztworu proteiny K, a następnie krótko wytrząsać w celu wymieszania.
9. Inkubować w temperaturze 56°C przez 20 minut.
10. Prześć do przygotowywania kartridża Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (rozdział 6.E).

6.B. Przygotowywanie próbek BAL lub próbek płwociny do użycia z zestawem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

1. W przypadku zamrożenia rozmrozić próbkę BAL lub próbkę płwociny w temperaturze pokojowej.
Uwaga: aby zmniejszyć lepkość próbek BAL i płwociny, rozcieńczyć w równomiernej objętości roztworu PBS 1X, przeprowadzić homogenizację mechaniczną lub rozcieńczyć i homogenizować przed przetwarzaniem.
2. W przypadku każdej próbki dodać 100–300 µl do próbki mikrowirówkowej o pojemności 1,5 ml. (Zalecamy stosowanie pipety z szerokim otworem). Używać świeżych końcówek pipet do każdej próbki, aby zapobiec zanieczyszczeniu między próbkami.
3. Dodać 12 µl 1-tioglicerolu i pipetować w celu wymieszania.
Uwaga: pipetować powoli, ponieważ roztwór jest lepki.
4. Dodać 300 µl buforu lizującego i mieszać na mieszadle typu vortex przez 10 sekund.
5. Inkubować w temperaturze 95°C przez 5 minut. Chłodzić na stole roboczym przez 2 minuty.
6. Dodać 30 µl roztworu proteinazy K, a następnie krótko wytrząsać w celu wymieszania.
7. Inkubować w temperaturze 56°C przez 20 minut.
8. Przejsć do przygotowywania kartridża Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (rozdział 6.E).

6.C. Przygotowywanie próbek moczu do użycia z zestawem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Przygotowywanie próbek o małej objętości (300 µl moczu):

1. Krótco wymieszać próbkę moczu, aby ponownie zawiesić jakiekolwiek osadzone komórki.
2. W przypadku każdej próbki dodać 300 µl moczu do probówki mikrowirówkowej o pojemności 1,5 ml. Używać świeżych końcówek pipet do każdej próbki, aby zapobiec zanieczyszczeniu między próbkami.
3. Dodać 300 µl buforu lizującego i mieszać na mieszadle typu vortex przez 10 sekund.
4. Dodać 30 µl roztworu proteinazy K, a następnie krótko wytrząsać w celu wymieszania.
5. Inkubować w temperaturze 56°C przez 20 minut.
6. Przejsć do przygotowywania kartridża Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (rozdział 6.E).

Przygotowywanie próbek o dużej objętości (30 ml moczu):

1. Krótco wymieszać próbkę moczu, aby ponownie zawiesić jakiekolwiek osadzone komórki.
2. W przypadku każdej próbki dodać 30 ml moczu do probówki o pojemności 50 ml. Używać świeżych końcówek pipet do każdej próbki, aby zapobiec zanieczyszczeniu między próbkami.
3. Odwirowywać próbkę moczu z szybkością 2000 × g przez 10 minut.
4. Usunąć supernatant za pomocą pipety, zachowując ostrożność, aby nie naruszyć osadu.
Uwaga: niektóre ciecze mogą pozostać w probówce w celu zachowania integralności osadu (do 300 µl).
5. Dodać 300 µl buforu lizującego do probówki i ponownie zawiesić osad poprzez pipetowanie.
6. Przenieść lizat do probówki o pojemności 1,5 ml.
7. Dodać 30 µl roztworu proteinazy K, a następnie krótko wytrząsać w celu wymieszania.
8. Inkubować w temperaturze 56°C przez 20 minut.
9. Przejsć do przygotowywania kartridża Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (rozdział 6.E).

6.D. Przygotowywanie próbek osocza, próbek wirusowego podłoża transportowego lub próbek podłoża Pap do użycia z zestawem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

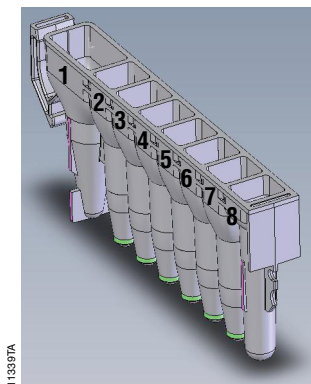
1. W przypadku zamrożenia rozmrozić osocze lub podłoże w temperaturze pokojowej i krótko je wytrząsać w celu wymieszania.
2. W przypadku każdej próbki dodać 300 µl osocza lub podłoża zawierającego próbkę biologiczną do próbówki mikrowirówkowej o pojemności 1,5 ml. Używać świeżych końcówek pipet do każdej próbki, aby zapobiec zanieczyszczeniu między próbkami.
3. Dodać 300 µl buforu lizującego i mieszać na mieszadłe typu vortex przez 10 sekund.
4. Dodać 30 µl roztworu proteinazy K, a następnie krótko wytrząsać w celu wymieszania.
5. Inkubować w temperaturze 56°C przez 20 minut.
6. Przejść do przygotowywania kartridża Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (rozdział 6.E).

6.E. Przygotowywanie kartridża Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge

1. Przed rozpoczęciem pracy z kartridżami, tłoczkami i próbówkami do elucji (0,5 ml) należy zmienić rękawiczki. Umieścić kartridże na stojaku na kartridże tak, aby dołek nr 1 (największy dołek w kartridżu) był skierowany w przeciwną stronę do próbek do elucji. Nacisnąć kartridż, aby zatrzasknął się w odpowiednim położeniu. Ostrożnie zdjąć zamknięcie tak, aby usunąć cały element z tworzywa sztucznego z górnej części kartridża. Przed umieszczeniem kartridży w urządzeniu upewnić się, że cała taśma uszczelniająca i pozostałości kleju zostały usunięte.
2. Umieścić jeden tłoczek w dołku nr 8 każdego kartridża.
3. Umieścić pustą próbówkę (0,5 ml) w położeniu próbówki do elucji dla każdego kartridża na tacach blatowych.
4. Na dnie każdej próbówki do elucji umieścić 100 µl buforu do elucji.
5. Krótko obracać lizaty próbki w mikrowirówce, aby pobrać płyn z dołu próbówki. Dodać lizat próbki do dołka nr 1 (największego dołka) kartridża. Do kartridża wolno dodać tylko lizat próbki.
6. Przejść do rozdziału 7 – Konfiguracja i uruchamianie urządzenia Maxwell®.

Uwagi:

- a. Wycieki próbki lub odczynnika na dowolną część stojaka na kartridże należy usuwać za pomocą roztworu detergentu i wody. Następnie należy spryskać powierzchnię sprayem bakteriobójczym lub wytrzeć ściereczką i przemyć ją wodą. Nie należy stosować wybielacza do czyszczenia części urządzenia.
- b. Używać wyłącznie próbek do elucji 0,5 ml dołączonych do zestawu; inne próbówki mogą być niezgodne z urządzeniem Maxwell® Instrument.



Użytkownik dodaje do dołków

1. Lizat próbki
8. Tłoczek CSC/RSC

Rysunek 1. Kartridż Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge. Wstępnie przetworzona próbka jest dodawana do dołka nr 1, a tłoczek jest wprowadzany do dołka nr 8.



Rysunek 2. Ustawianie i konfiguracja stojaków na kartridże. Bufor do elucji jest dodawany do probówek do elucji we wskazany sposób. Tłoczki znajdują się w dołku nr 8 kartridża.

7. Konfiguracja i uruchamianie urządzenia Maxwell®

Więcej informacji znajduje się w instrukcji technicznej określonego urządzenia Maxwell® (patrz Tabela 1).

1. Włączyć urządzenie Maxwell® i tablet. Zalogować się na tablecie i uruchomić oprogramowanie Maxwell® IVD Mode, dwukrotnie dotykając ikony na pulpicie. Urządzenie włączy się, przeprowadzi autotest i ustawi w położeniu wyjściowym wszystkie ruchome części.
2. Dotknąć przycisku **Start**, aby rozpocząć proces uruchamiania przebiegu metody.
3. Zeskanować lub wprowadzić kod kreskowy metody znajdujący się w prawym górnym rogu zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit, aby automatycznie wybrać metodę, która zostanie zastosowana (Rysunek 3).

Uwaga: Kod kreskowy zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit jest wymagany do procedury oczyszczania przeprowadzanej w urządzeniach Maxwell® CSC Instrument. Etykieta zestawu zawiera dwa kody kreskowe. Kod kreskowy metody pokazano na Rysunku 3 poniżej. Jeżeli nie można zeskanować kodu kreskowego, należy skontaktować się z działem Promega Technical Services.



Rysunek 3. Etykieta zestawu z kodem kreskowym metody do zeskanowania. Kod kreskowy do zeskanowania, służący do uruchomienia cyklu oczyszczania, znajduje się w czerwonej ramce, w prawym górnym rogu etykiety zestawu.

4. Na ekranie „Konfiguracja kartridży” dotknąć pozycji kartridża, aby zaznaczyć lub odznaczyć wszelkie położenia, które mają zostać użyte w ramach przebiegu ekstrakcji. Wprowadzić wymagane dane identyfikacyjne próbek i nacisnąć przycisk **Rozpocznij**, aby kontynuować.

Uwaga: Podczas użytkowania urządzenia Maxwell® Instrument z 48 pozycjami nacisnąć przyciski **Przód** i **Wstecz**, aby wybrać lub cofnąć wybór pozycji kasety na każdej tacy blatowej.

5. Po otwarciu drzwi potwierdzić, czy wykonano wszystkie czynności z listy kontrolnej ekstrakcji. Sprawdzić, czy próbki zostały dodane do dołka nr 1 kartridży, czy kartridże zostały załadowane do urządzenia, czy otwarte probówki do elucji zawierające bufor do elucji są obecne oraz czy tłoczki zostały umieszczone w dołku nr 8. Przenieść stojaki na kartridże zawierające przygotowane kartridże do platformy urządzenia Maxwell®.

Wkładanie tacy blatowej Maxwell® Deck Tray: Stojak na kartridże należy trzymać za brzegi, aby uniknąć wypadnięcia kartridży. Upewnić się, że stojak na kartridże został umieszczony w urządzeniu Maxwell® w taki sposób, że probówki do elucji znajdują się najbliżej drzwi. Przetawić tył stojaka na kartridże w dół i ustawić ją na urządzeniu tak, aby jej tył był oparty o tylną część platformy urządzenia. Docisnąć przednią część stojaka na kartridże, aby osadzić go na platformie urządzenia. W przypadku trudności z ustawieniem stojaka na kartridże na platformie sprawdzić, czy stojak na kartridże jest ułożony w prawidłowej orientacji. Upewnić się, że stojak na kartridże jest odpowiednio wyrównany i osadzony na platformie urządzenia.

Uwaga: Sprawdzić identyfikator na stojakach na kartridże Maxwell® z 24 pozycjami, aby określić, czy powinny zostać umieszczone z przodu, czy z tyłu urządzenia.

6. Potwierdzić, że wszystkie czynności wskazane przed rozpoczęciem przetwarzania zostały wykonane, i dotknąć przycisku **Start**, aby zamknąć drzwi urządzenia i rozpocząć przetwarzanie.

Uwaga: W przypadku korzystania z urządzenia Maxwell® Instrument z 48 pozycjami i włączenia systemu wizualizacji skanowanie stojaków na kartridże rozpocznie się po zamknięciu drzwi. Wszelkie błędy w konfiguracji stojaków na kartridże (np. tłoczki nieznajdujące się w dołku nr 8, brak otwartych probówek do elucji) spowodują, że oprogramowanie powróci do ekranu „Konfiguracja kartridży”, a problematyczne pozycje zostaną oznaczone wykrzyknikiem w czerwonym okręgu. Dotknąć wykrzyknika, aby uzyskać opis błędu i rozwiązać problemy związane z błędami. Ponownie dotknąć przycisku **Start**, aby powtórzyć skanowanie stojaków na kartridże i rozpocząć przebieg ekstrakcji.



Ostrzeżenie: Niebezpieczeństwo zmiążdżenia.

Urządzenie Maxwell® natychmiast rozpocznie cykl oczyszczania. Na ekranie wyświetlą się informacje o użytkowniku, który uruchomił przebieg, o kroku metody, który jest obecnie wykonywany, oraz o szacowanym czasie pozostałym do końca przebiegu.

Uwagi:

- a. Dotknięcie przycisku **Przerwij** spowoduje przerwanie przebiegu. Wszystkie próbki z przerwane przebiegu zostaną utracone.
 - b. Jeśli przebieg zostanie przerwany przed ukończeniem, może wyświetlić się monit z prośbą o sprawdzenie, czy tłoczki są nadal załadowane na słupku tłoczków. Jeśli tłoczki znajdują się na słupku tłoczków, należy przeprowadzić procedurę **Czyszczenie** po wyświetleniu monitu. Jeśli tłoczki nie znajdują się na słupku tłoczków, można pominąć procedurę **Czyszczenie**. Próbkę zostanie utracona. Nie wolno podejmować prób ponownego oczyszczenia próbek, jeśli przebieg urządzenia został przerwany.
7. Po zakończeniu metody postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie, aby otworzyć drzwi. Sprawdzić, czy tłoczki znajdują się w dołku nr 8 kartridża po zakończeniu cyklu. Jeśli tłoczki nie zostaną usunięte ze słupka tłoczków, należy postępować zgodnie z wytycznymi przedstawionymi w instrukcji technicznej określonego urządzenia Maxwell® Instrument (patrz Tabela 1), aby przeprowadzić procedurę **Czyszczenie** i podjąć próbę rozładunku tłoczków.
 8. Wyjąć stojaki na kartridże z urządzenia. Wyjąć probówki do elucji zawierające wirusowy całkowity kwas nukleinowy, a następnie zatkać probówki. Jeśli cząsteczki paramagnetyczne występują w probówkach do elucji, odwirowywać z szybkością 10 000–20 000 × g przez okres od 30 sekund do 1 minuty, a następnie przenieść supernatant do probówek do przechowywania (nie wchodzi w skład zestawu). Po zakończeniu przebiegu wyświetlony zostanie raport z przebiegu ekstrakcji. Na ekranie „Widok raportu” można wydrukować lub eksportować niniejszy raport albo wykonać obie te czynności.
 9. Kartridże i tłoczki należy usunąć ze stojaków na kartridże i utylizować jako odpady niebezpieczne zgodnie z zalecanymi procedurami instytucjonalnymi. Nie wolno ponownie używać kartridży z odczynnikami, tłoczków ani rurek do elucji.

Uwaga: przed użyciem promieniowania ultrafioletowego upewnić się, że próbki zostały usunięte z urządzenia w celu zapobieżenia uszkodzeniu kwasu nukleinowego.

8. Przechowywanie eluowanego kwasu nukleinowego

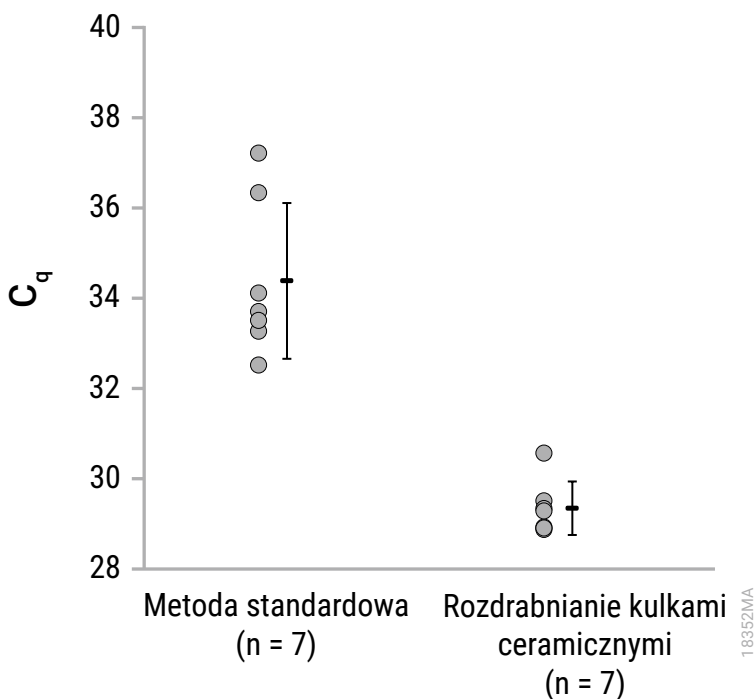
Jeśli próbki nie zostaną przetworzone natychmiast, można przechowywać eluowane patogenne DNA na lodzie lub w temperaturze 4°C przez maksymalnie 24 godziny. W przypadku przechowywania przez dłuższy czas należy zamrozić próbki w temperaturze –20°C lub –70°C. RNA jest mniej stabilne, w związku z czym należy je testować w dalszych analizach natychmiast po izolacji. W przypadku testowania wkrótce po izolacji przechowywać patogenne RNA na lodzie lub w temperaturze 4°C. Można również przechowywać eluowane patogenne RNA w temperaturze –70°C. Aby uzyskać szczegółowe informacje na temat przechowywania i obsługi próbek, należy zapoznać się z instrukcjami dotyczącymi dalszych zastosowań.

9. Ocena wydajności analitycznej

Ocena wydajności analitycznej zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit została wykonana za pomocą różnych typów próbek wirusowych wzbogaconych inaktywowanymi patogenami przetworzonymi w urządzeniach Maxwell® CSC i Maxwell® CSC 48 Instrument.

9.A. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji DNA

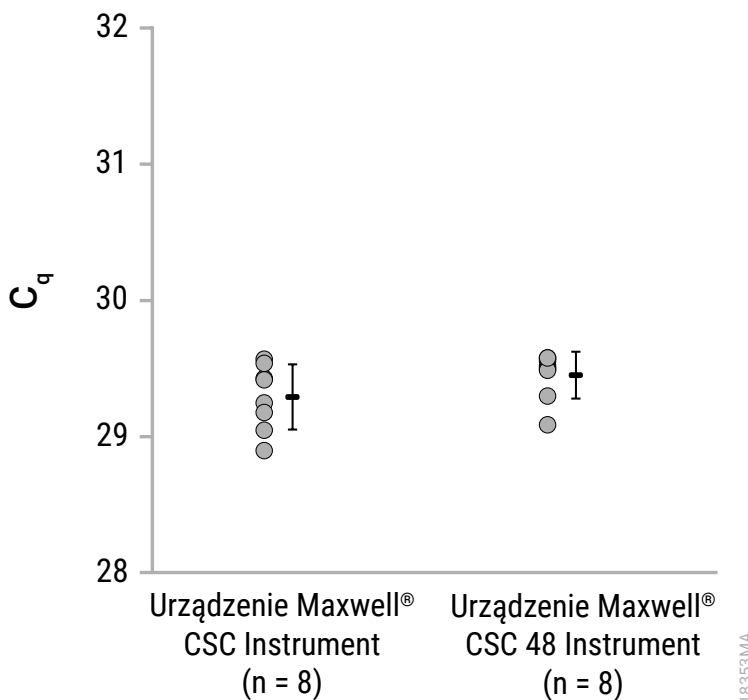
Całkowity kwas nukleinowy został wyekstrahowany z powtórzeń o pojemności 300 µl zawiesiny kału, a każde z nich zostało wzbogacone około $2,5 \times 10^4$ kopiami inaktywowanego pierwotniaka *Giardia lamblia* za pomocą standardowej metody wstępnego przetwarzania lub metody wstępnego przetwarzania polegającej na rozdrabnianiu kulkami ceramicznymi. Całkowity kwas nukleinowy został eluowany za pomocą 100 µl buforu do elucji. Aby amplifikować docelowe DNA swoiste dla pierwotniaka *G. lamblia*, w ramach testu qPCR użyto pięciu mikrolitrów każdego nierozcieńczonego eluatu. Średnia wartość C_q wygenerowana za pomocą standardowej metody wynosiła 34,39 cyklu. Średnia wartość C_q wygenerowana za pomocą metody polegającej na rozdrabnianiu kulkami ceramicznymi wynosiła 29,35 cyklu.



Rysunek 4. Amplifikacja sekwencji docelowego DNA *G. lamblia* za pomocą całkowitego kwasu nukleinowego wyekstrahowanego z próbek kału wykorzystujących metodę standardową i metodą rozdrabniania kulkami ceramicznymi.

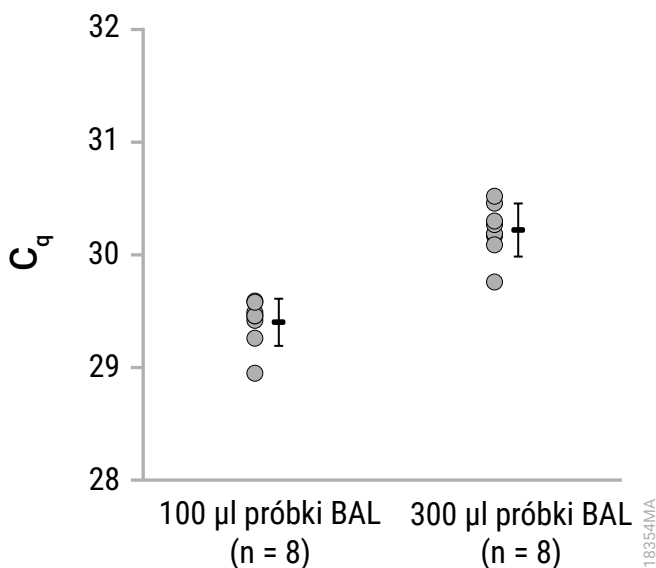
9.B. Ilość, jakość i zdolność do amplifikacji RNA

Aby wykazać, że wydajność zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit jest podobna w przypadku stosowania wraz z urządzeniem Maxwell® CSC lub Maxwell® CSC 48 Instrument, całkowity kwas nukleinowy został wyekstrahowany przy użyciu zestawu i obu aparatów z ośmiu powtórzeń o pojemności 300 µl próbek płwociny, wzbogaconych 1×10^4 kopiami inaktywowanego wirusa SARS CoV-2. Całkowity kwas nukleinowy został eluowany w 100 µl buforu do elucji, a 5 µl każdego eluatu zostało użyte w ramach testu RT-qPCR, aby amplifikować sekwencję docelowego RNA swoistą dla wirusa SARS CoV-2. Porównanie wyników testu RT-qPCR uzyskanych z całkowitego kwasu nukleinowego wyekstrahowanego za pomocą urządzenia Maxwell® CSC Instrument i urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument wykazało, że wszystkie wartości $|\Delta C_q|$ wynosiły $\leq 0,59$ cyklu, przy średniej wartości $|\Delta C_q|$ wynoszącej 0,16 cyklu.



Rysunek 5. Amplifikacja całkowitego kwasu nukleinowego wyekstrahowanego z próbek płwociny zawierających wirusa SARS-CoV-2 przy użyciu urządzenia Maxwell® CSC lub Maxwell® CSC 48 Instrument.

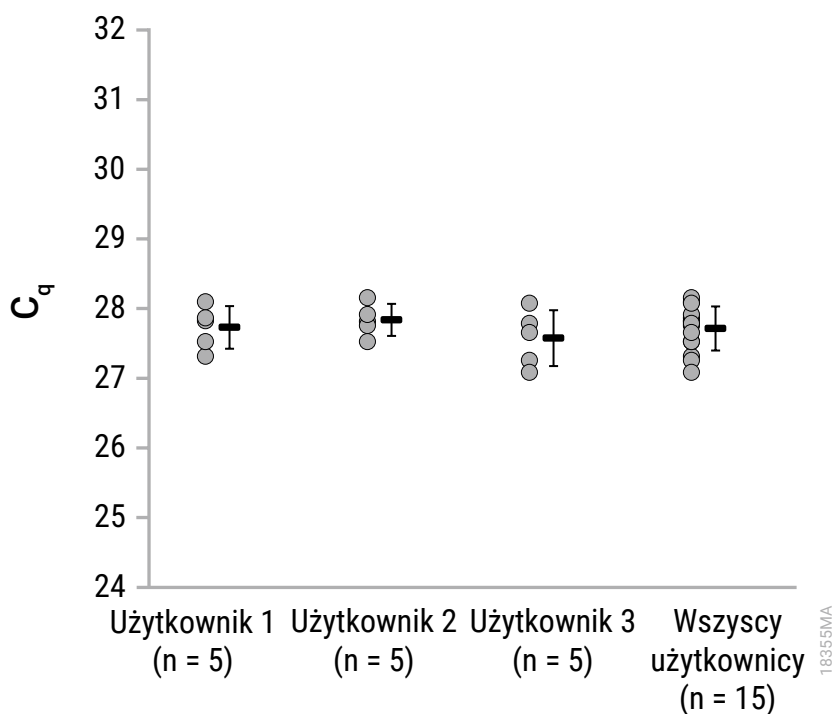
Całkowity kwas nukleinowy został równolegle oczyszczony z objętości 300 μ l oraz 100 μ l próbek z płukania oskrzelowo-płucne (BAL), a każdą z nich wzbogacono 1×10^4 kopiami inaktywowanego wirusa SARS CoV-2, aby ocenić efekt wywierany przez różne ilości macierzy próbek na amplifikację. Całkowity kwas nukleinowy został eluowany w 100 μ l buforu do elucji, a 5 μ l każdego nierozcieńczonego eluatu zostało użyte w ramach testu RT-qPCR, aby amplifikować sekwencję docelowego RNA swoistą dla wirusa SARS CoV-2. Wszystkie wartości C_q dla całkowitego kwasu nukleinowego oczyszczonego z 300 μ l płwociny wynosiły $\leq 30,86$ cyklu, przy średniej wartości C_q wynoszącej 30,56 cyklu. Wszystkie wartości C_q dla całkowitego kwasu nukleinowego oczyszczonego ze 100 μ l próbki BAL wynosiły $\leq 29,93$ cyklu, przy średniej wartości C_q wynoszącej 29,74 cyklu.



Rysunek 6. Amplifikacja sekwencji docelowego RNA wirusa SARS CoV-2 z wykorzystaniem całkowitego kwasu nukleinowego wyekstrahowanego z różnych objętości wejściowych próbek.

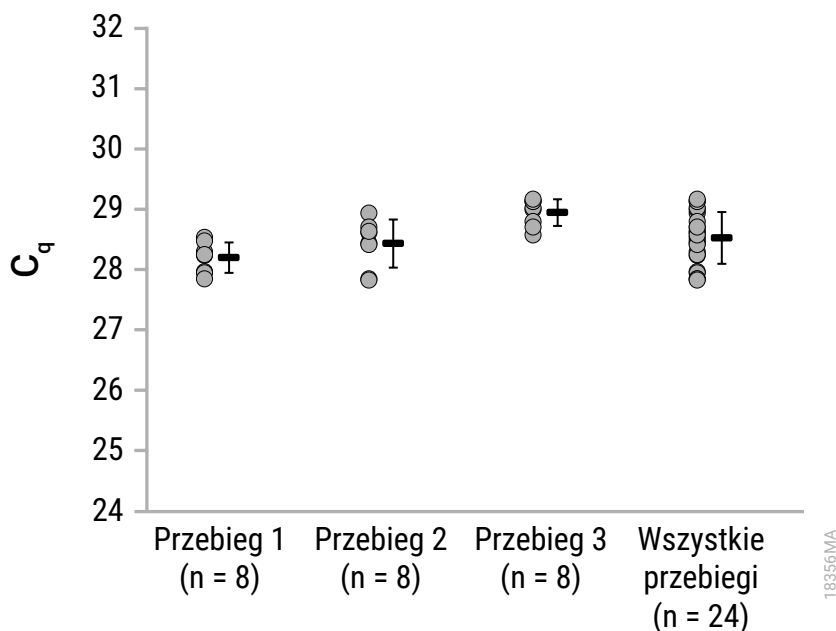
9.C. Odtwarzalność

Aby ocenić odtwarzalność ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit między użytkownikami, trzech użytkowników wstępnie przetworzyło pięć powtórzeń o pojemności 300 µl uniwersalnego podłoża transportowego (UTM) wzbogaconego bakteriami *Bordetella pertussis*, a całkowity kwas nukleinowy został wyekstrahowany w tym samym przebiegu urządzenia Maxwell® CSC Instrument. Kwas nukleinowy został eluowany za pomocą 100 µl buforu do elucji. Pięć mikrolitrów nierozcieńczonego eluatu zostało użytych w teście qPCR, aby amplifikować sekwencję docelowego DNA swoistą dla bakterii *B. pertussis*. Obliczono również średnią wartość C_q i wartość odchylenia standardowego. Oczyszczanie całkowitego kwasu nukleinowego było odtwarzalne, przy odchyleniach standardowych wynoszących 0,31 cyklu (użytkownik 1), 0,23 cyklu (użytkownik 2) i 0,40 cyklu (użytkownik 3). W przypadku wszystkich trzech użytkowników odchylenie standardowe wynosiło 0,32 cyklu.



Rysunek 7. Odtwarzalność ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego między trzema użytkownikami.

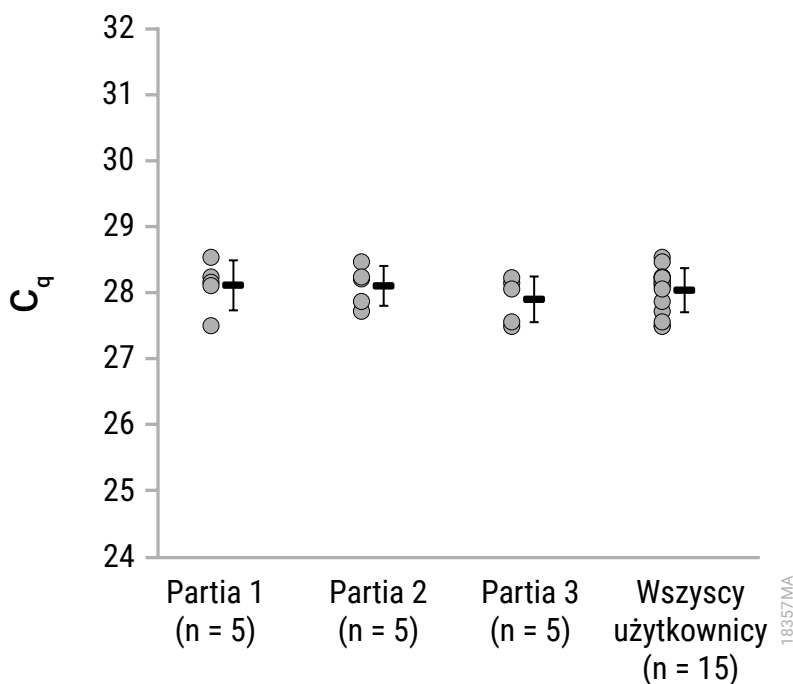
Aby ocenić odtwarzalność ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego między różnymi przebiegami ekstrakcji, jeden użytkownik wykonał trzy różne przebiegi ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego za pomocą ośmiu powtórzeń 300 µl podłoża UTM wzbogaconego bakteriami *B. pertussis* za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit i urządzeń Maxwell® CSC Instrument. Podczas każdego z trzech oddzielnych przebiegów całkowity kwas nukleinowy został eluowany w 100 µl buforu do elucji. Pięć mikrolitrów nierozcieńczonego eluatu zostało użytych w teście qPCR, aby amplifikować sekwencję docelowego DNA swoistą dla bakterii *B. pertussis*. Obliczono również średnią wartość C_q i wartość odchylenia standardowego. Oczyszczanie całkowitego kwasu nukleinowego było odtwarzalne, przy odchyleniach standardowych wynoszących 0,25 cyklu (przebieg 1), 0,40 cyklu (przebieg 2) i 0,22 cyklu (przebieg 3). W przypadku wszystkich trzech przebiegów odchylenie standardowe wynosiło 0,43 cyklu.



Rysunek 8. Odtwarzalność ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego między trzema przebiegami ekstrakcji wykonanymi przez jednego użytkownika.

9.C. Odtwarzalność (ciąg dalszy)

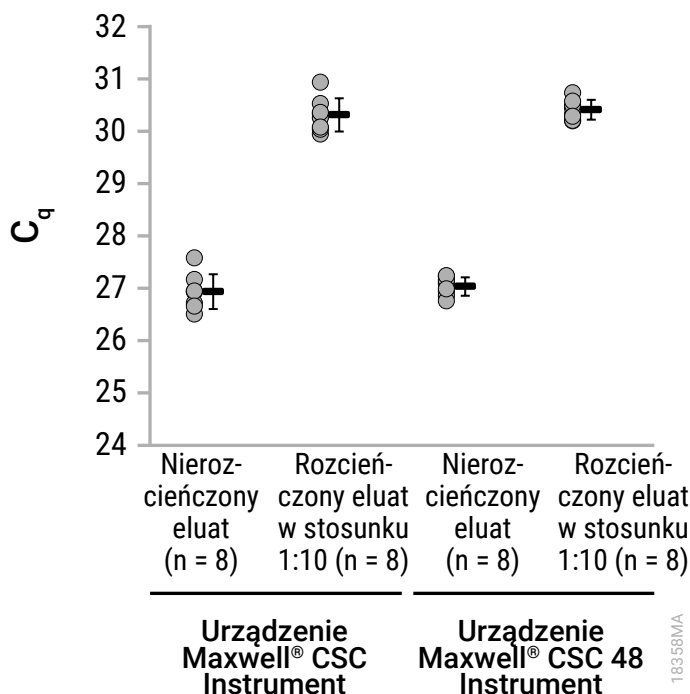
Aby ocenić odtwarzalność ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego między różnymi partiami zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit, całkowity kwas nukleinowy został oczyszczony z powtórzeń o pojemności 300 µl próbek UTM wzbogaconych *B. pertussis* za pomocą trzech partii zestawów, z których każdy zawierał unikalne partie kluczowych odczynników. Każdy nierozcieńczony eluat został użyty w teście qPCR, aby amplifikować sekwencję docelowego DNA swoistą dla bakterii *B. pertussis*. Obliczono również średnią wartość C_q i wartość odchylenia standardowego. Odchylenie standardowe wartości C_q wygenerowane za pomocą partii 1, 2 i 3 wynosiło odpowiednio 0,38 cyklu, 0,30 cyklu i 0,35 cyklu. Odchylenie standardowe dla wartości C_q między wszystkimi trzema partiami wynosiło 0,34 cyklu.



Rysunek 9. Odtwarzalność ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego między trzema różnymi partiami zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.

9.D. Inhibicja amplifikacji ze względu na substancje zakłócające

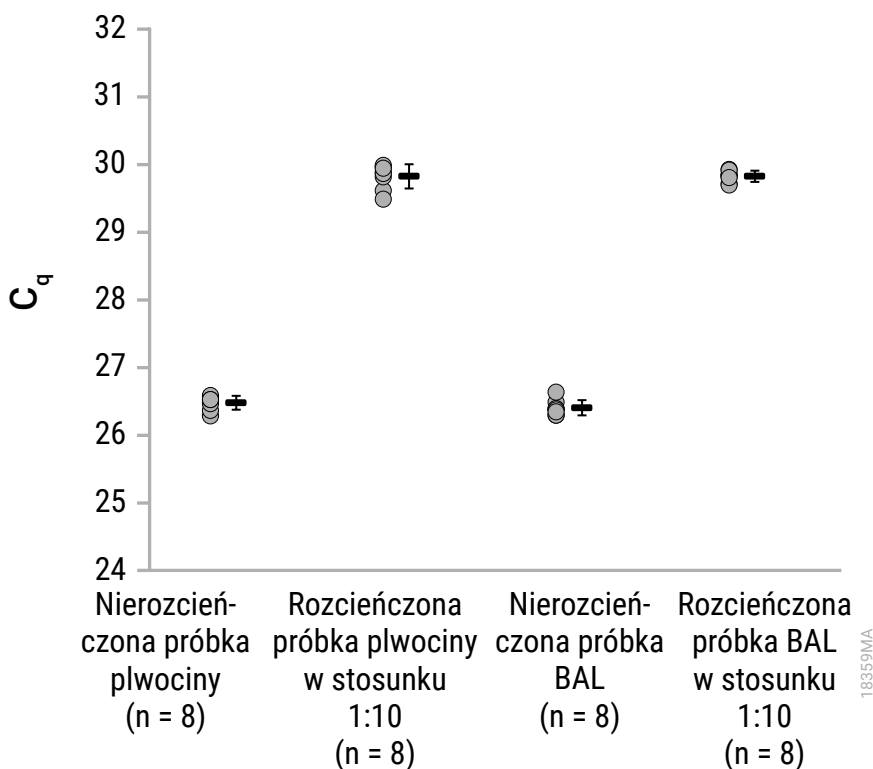
Aby ocenić dowolną inhibicję w zakresie amplifikacji ze względu na substancje zakłócające, które współocyszczają całkowity kwas nukleinowy, kwas ten został oczyszczony z ośmiu powtórzeń o pojemności 300 μ l zawiesiny kału wzbogaconej 3×10^4 komórkami inaktywowanych bakterii *Clostridium difficile*. W teście qPCR użyto pięciu mikrolitrów każdego nierozcieńczonego eluatu całkowitego kwasu nukleinowego i 5 μ l dziesięciokrotnego rozcieńczenia każdego eluatu, aby amplifikować docelowe DNA swoiste dla bakterii *C. difficile* w celu oceny efektu wywieranego przez substancje zakłócające. W przypadku urządzenia Maxwell® CSC Instrument wszystkie wartości C_q dla nierozcieńczonych eluatów wynosiły $\leq 27,57$ cyklu, przy średniej wartości C_q wynoszącej 26,93 cyklu. W przypadku urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument wszystkie wartości C_q dla nierozcieńczonych eluatów wynosiły $\leq 27,24$ cyklu, przy średniej wartości C_q wynoszącej 27,03 cyklu. Dokonano porównania wartości C_q z nierozcieńczonych eluatów i dziesięciokrotnie rozcieńczonych eluatów w celu oceny inhibicji w ramach poszczególnych eluatów z wykorzystaniem oczekiwanej wartości ΔC_q wynoszącej $> 2,5$ cyklu, co wskazuje na brak inhibicji. Wartość ΔC_q nierozcieńczonych i dziesięciokrotnie rozcieńczonych eluatów w zakresie poszczególnych próbek mieściła się w zakresie od 3,24 do 3,59, co wskazuje, że jakiegokolwiek substancje zakłócające występujące w eluacie powodują minimalną inhibicję.



Rysunek 10. Ocena inhibicji amplifikacji całkowitego kwasu nukleinowego wyekstrahowanego za pomocą urządzenia Maxwell® CSC or the Maxwell® CSC 48 Instrument.

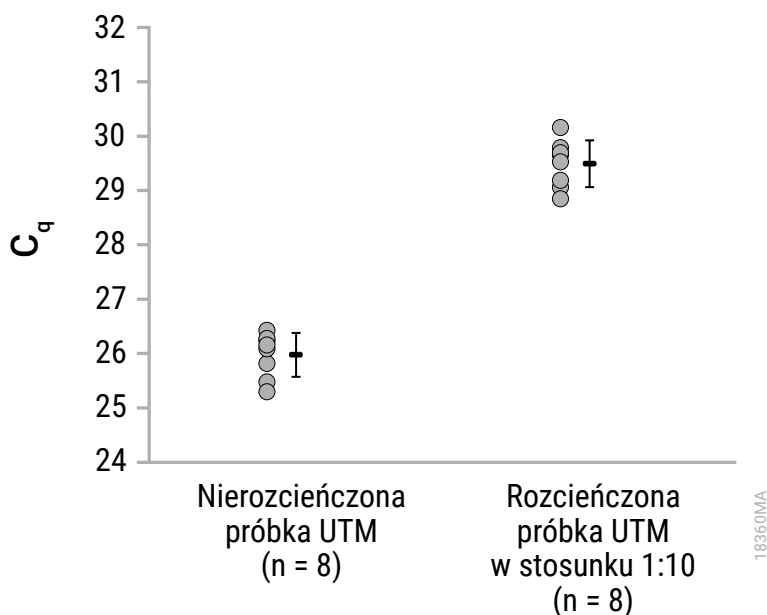
9.D. Inhibicja amplifikacji ze względu na substancje zakłócające (ciąg dalszy)

Całkowity kwas nukleinowy wyekstrahowano z ośmiu powtórzeń o pojemności 300 µl próbek płwociny i próbek BAL wzbogaconych 9×10^4 kopiami inaktywowanych bakterii *Chlamydia pneumoniae* i eluowanych w 100 µl buforu do elucji. W teście qPCR użyto pięciu mikrolitrów każdego nierozcieńczonego eluatu całkowitego kwasu nukleinowego i 5 µl dziesięciokrotnego rozcieńczenia każdego eluatu, aby amplifikować docelowe DNA swoiste dla bakterii *C. pneumoniae* w celu oceny efektu wywieranego przez substancje zakłócające. Wszystkie wartości C_q dla nierozcieńczonych eluatów całkowitego kwasu nukleinowego z płwociny wynosiły $\leq 26,59$ cyklu, przy średniej wartości C_q wynoszącej 26,48 cyklu. Średnia wartość C_q dla rozcieńczenia 1:10 eluatów całkowitego kwasu nukleinowego z płwociny wynosiła 29,83 cyklu, przy różnicy między średnimi wartościami C_q w zakresie rozcieńczonych i nierozcieńczonych próbek wynoszącej 3,35 cyklu. Wszystkie wartości C_q dla nierozcieńczonych eluatów z próbek BAL wynosiły $\leq 26,64$ cyklu, przy średniej wartości C_q wynoszącej 26,41 cyklu. Średnia wartość C_q dla rozcieńczenia 1:10 eluatów całkowitego kwasu nukleinowego z próbki BAL wynosiła 29,83 cyklu, przy różnicy między średnimi wartościami C_q w zakresie rozcieńczonych i nierozcieńczonych próbek wynoszącej 3,42 cyklu, co wskazuje na to, że występowanie jakichkolwiek substancji zakłócających w eluacie spowodowało minimalną inhibicję.



Rysunek 11. Ocena inhibicji amplifikacji całkowitego kwasu nukleinowego wyekstrahowanego z próbki płwociny i próbki BAL.

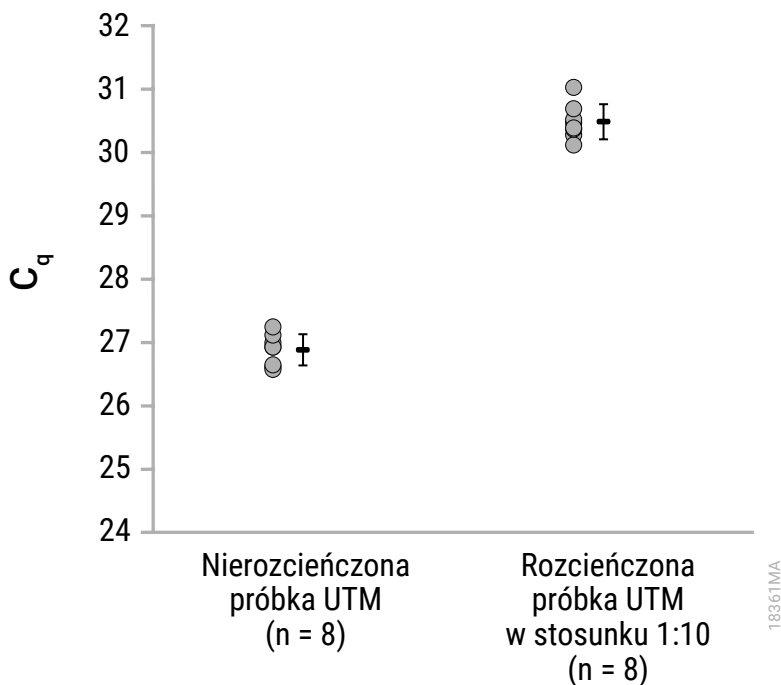
Inhibicję amplifikacji oceniono poprzez ekstrakcję całkowitego kwasu nukleinowego z próbek UTM wzbogaconych inaktywowaną bakteriami *B. pertussis* i amplifikację wynikowego całkowitego kwasu nukleinowego w ramach testu qPCR. Podsumowując, całkowity kwas nukleinowy wyekstrahowano z ośmiu powtórzeń o pojemności 300 μ l próbek UTM wzbogaconych około 1×10^4 kopiami inaktywowanych bakterii *B. pertussis* i eluowanych w 100 μ l buforu do elucji. W teście qPCR użyto pięciu mikrolitrów każdego nierozcieńczonego eluatu całkowitego kwasu nukleinowego i 5 μ l dziesięciokrotnego rozcieńczenia każdego eluatu, aby amplifikować docelowe DNA swoiste dla bakterii *C. pneumoniae* w celu oceny efektu wywieranego przez substancje zakłócające. Średnia wartość C_q w zakresie nierozcieńczonych eluatów uzyskanych z próbek UTM wynosiła 25,97 cyklu. Średnia wartość C_q dla rozcieńczenia 1:10 eluatów wynosiła 29,49 cyklu, przy różnicy między średnimi wartościami C_q w zakresie rozcieńczonych i nierozcieńczonych próbek wynoszącej 3,52 cyklu, co wskazuje na to, że występowanie jakichkolwiek substancji zakłócających w eluacie spowodowało minimalną inhibicję.



Rysunek 12. Ocena inhibicji amplifikacji całkowitego kwasu nukleinowego wyekstrahowanego z próbek UTM wzbogaconych bakteriami *B. pertussis*.

9.D. Inhibicja amplifikacji ze względu na substancje zakłócające (ciąg dalszy)

Inhibicję amplifikacji oceniono poprzez wyekstrahowanie całkowitego kwasu nukleinowego z próbek UTM wzbogaconych inaktywowanym wirusem opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1). Całkowity kwas nukleinowy wyekstrahowano z ośmiu powtórzeń o pojemności 300 µl próbek UTM wzbogaconych około 1×10^5 kopiami inaktywowanego wirusa HSV-1 i eluowanych w 100 µl buforu do elucji. W teście qPCR użyto pięciu mikrolitrów każdego nierozcieńczonego eluatu całkowitego kwasu nukleinowego i 5 µl dziesięciokrotnego rozcieńczenia każdego eluatu, aby amplifikować docelowe DNA swoiste dla wirusa HSV-1 w celu oceny efektu wywieranego przez substancje zakłócające. Wszystkie wartości C_q dla nierozcieńczonych eluatów wynosiły $\leq 27,25$ cyklu, przy średniej wartości C_q wynoszącej 26,88 cyklu. Wartość ΔC_q nierozcieńczonych i dziesięciokrotnie rozcieńczonych eluatów w zakresie poszczególnych próbek mieściła się w zakresie od 3,44 do 3,91, co wskazuje, że jakiegokolwiek substancje zakłócające występujące w eluacie powodują minimalną inhibicję.



Rysunek 13. Ocena inhibicji amplifikacji całkowitego kwasu nukleinowego wyekstrahowanego z próbek UTM wzbogaconych wirusem HSV-1.

9.E. Zanieczyszczenie krzyżowe

Zanieczyszczenie krzyżowe oceniono za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit i urządzenia Maxwell® CSC Instrument poprzez naprzemienne stosowanie kartridży Maxwell® CSC Cartridge zawierających próbki UTM wzbogacone inaktywowanymi bakteriami *B. pertussis* i ujemne próbki bez dodanych bakterii *B. pertussis* w tacy blatowej Maxwell® Deck Tray w ramach pojedynczego przebiegu ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego. Eluatów z próbek UTM dodatnich i ujemnych pod kątem bakterii *B. pertussis* użyto w teście qPCR, aby amplifikować docelowe DNA swoiste dla bakterii *B. pertussis*, a wynikowe wartości C_q porównano z krzywą standardową (10^1 – 10^6 kopii) wygenerowaną za pomocą seryjnych rozcieńczeń syntetycznego DNA przy użyciu sekwencji docelowej bakterii *B. pertussis*. Wszystkie eluaty UTM z dodanymi bakteriami *B. pertussis* miały wartości C_q mieszczące się na krzywej standardowej, przy średniej wynoszącej C_q 25,42 cyklu. Wszystkie ujemne eluaty UTM bez dodanych bakterii *B. pertussis* miały wartości C_q wyższe niż wartość C_q uzyskana dla najniższego stężenia DNA w ramach krzywej standardowej (10 kopii).

10. Ocena wydajności klinicznej

Ocenę wydajności klinicznej zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit przeprowadziło zewnętrzne laboratorium kliniczne z wykorzystaniem urządzenia Maxwell® CSC 48 Instrument, aby wyekstrahować kwas nukleinowy patogenu z typów próbek klinicznych określonych poniżej w celu amplifikacji kwasu nukleinowego w ramach testu o znaczeniu klinicznym.

Tabela 2. *Clostridium difficile* – ekstrakcja całkowitego kwasu nukleinowego z próbek kału. Całkowity kwas nukleinowy został wyekstrahowany przez jednego testera z 200 mg każdej z dziesięciu ludzkich próbek kału dodatnich pod kątem bakterii *Clostridium difficile* (*C. difficile*) i dziesięciu ludzkich próbek kału ujemnych pod kątem bakterii *C. difficile* za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Kwas nukleinowy został również oczyszczony za pomocą tych próbek przy użyciu standardowej laboratoryjnej metody oczyszczania na potrzeby odniesienia. Wynikowe eluaty przeanalizowano poprzez amplifikację docelowego DNA toksyny A i toksyny B bakterii *C. difficile* w teście qPCR. Kwas nukleinowy wyekstrahowany ze wszystkich próbek potencjalnie ujemnych pod kątem bakterii *C. difficile* i próbek potencjalnie dodatnich pod kątem bakterii *C. difficile* za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit przyniósł oczekiwany rezultat i wykazał zgodność między wynikami uzyskanymi z kwasu nukleinowego wyekstrahowanego przy użyciu laboratoryjnej metody referencyjnej ekstrakcji.

	System Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Laboratoryjna metoda referencyjna
Próbki ujemne pod kątem bakterii <i>C. difficile</i>	10/10	10/10
Próbki dodatnie pod kątem bakterii <i>C. difficile</i>	10/10	10/10

10. Ocena wydajności klinicznej (ciąg dalszy)

Tabela 3. Cytomegalowirus – ekstrakcja całkowitego kwasu nukleinowego z próbek z płukania oskrzelowo-płucnego (BAL). Całkowity kwas nukleinowy został wyekstrahowany przez jednego testera z dziesięciu ludzkich próbek BAL dodatnich pod kątem cytomegalowirusa (CMV) (100 µl i 300 µl) i ujemnych pod kątem wirusa CMV (300 µl) za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Oprócz tego całkowity kwas nukleinowy został wyekstrahowany z 300 µl tych samych dziesięciu próbek BAL dodatnich pod kątem wirusa CMV i dziesięciu próbek BAL ujemnych pod kątem wirusa CMV za pomocą laboratoryjnej standardowej metody oczyszczania na potrzeby odniesienia. Wynikowe eluaty przeanalizowano poprzez amplifikację docelowego DNA głównego genu natychmiastowej odpowiedzi w teście qPCR. Kwas nukleinowy wyekstrahowany ze wszystkich próbek potencjalnie ujemnych pod kątem wirusa CMV i próbek potencjalnie dodatnich pod kątem wirusa CMV (obie próbki 100 µl i 300 µl) za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit przyniósł oczekiwany rezultat i wykazał zgodność między wynikami uzyskanymi z kwasu nukleinowego wyekstrahowanego przy użyciu laboratoryjnej metody referencyjnej ekstrakcji.

	System Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Laboratoryjna metoda referencyjna
Próbki ujemne pod kątem wirusa CMV	10/10 w przypadku objętości wejściowej 300 µl	10/10 w przypadku objętości wejściowej 300 µl
Próbki dodatnie pod kątem wirusa CMV	10/10 w przypadku objętości wejściowej 100 µl 10/10 w przypadku objętości wejściowej 300 µl	10/10 w przypadku objętości wejściowej 300 µl

Tabela 4. SARS-CoV-2 – ekstrakcja całkowitego kwasu nukleinowego z próbek wirusowego podłoża transportowego (VTM). Dwóch testerów wyekstrahowało całkowity kwas nukleinowy z 300 µl podłoża VTM, które zawierało próbkę wymazu z jamy nosowo-gardłowej. Całkowity kwas nukleinowy został wyekstrahowany z dziesięciu ludzkich próbek VTM dodatnich pod kątem wirusa SARS CoV-2 i dziesięciu ludzkich próbek VTM ujemnych pod kątem wirusa SARS CoV-2 przez dwóch testerów za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Jeden tester wyekstrahował również kwas nukleinowy z tych samych próbek za pomocą standardowej laboratoryjnej metody oczyszczania na potrzeby odniesienia. Wynikowe eluaty przeanalizowano poprzez amplifikację genów RdRP i N wirusa SARS CoV-2 w ramach testu RT-qPCR. Kwas nukleinowy wyekstrahowany ze wszystkich próbek potencjalnie ujemnych pod kątem wirusa SARS CoV-2 i próbek potencjalnie dodatnich pod kątem wirusa SARS CoV-2 oczyszczonych przez obu testerów za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit przyniósł oczekiwany rezultat i wykazał zgodność między wynikami uzyskanymi z kwasu nukleinowego wyekstrahowanego przy użyciu laboratoryjnej metody referencyjnej ekstrakcji.

	System Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Laboratoryjna metoda referencyjna
Próbki ujemne pod kątem wirusa SARS-CoV-2	10/10 w przypadku testera A 10/10 w przypadku testera B	10/10
Próbki dodatnie pod kątem wirusa SARS-CoV-2	10/10 w przypadku testera A 10/10 w przypadku testera B	10/10

Tabela 5. Wirus brodawczaka ludzkiego – ekstrakcja całkowitego kwasu nukleinowego z próbek podłoża Pap. Jeden tester wyekstrahował całkowity kwas nukleinowy z 300 µl próbek podłoża ThinPrep® PAP, które zawierało pobrany od ludzi wymaz z szyjki macicy. Całkowity kwas nukleinowy został wyekstrahowany z dziewięciu próbek podłoża Pap dodatnich pod kątem wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV) i dziewięciu próbek podłoża Pap ujemnych pod kątem wirusa HPV za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Kwas nukleinowy został również wyekstrahowany z tych samych próbek przy użyciu standardowej laboratoryjnej metody oczyszczania na potrzeby odniesienia. Wynikowe eluaty przeanalizowano poprzez amplifikację docelowego DNA wirusa HPV-16, HPV-18 i wirusa HPV o podwyższonym ryzyku w teście qPCR. Kwas nukleinowy wyekstrahowany ze wszystkich próbek podłoża Pap dodatnich pod kątem wirusa HPV wyekstrahowanych za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit przyniósł oczekiwany rezultat i wykazał zgodność między wynikami uzyskanymi z kwasu nukleinowego wyekstrahowanego przy użyciu laboratoryjnej metody referencyjnej ekstrakcji.

	System Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Laboratoryjna metoda referencyjna
Próbki ujemne pod kątem wirusa HPV	9/9	9/9
Próbki dodatnie pod kątem wirusa HPV	9/9	9/9

Tabela 6. Cytomegalowirus – ekstrakcja całkowitego kwasu nukleinowego z próbek moczu. Całkowity kwas nukleinowy został wyekstrahowany przez jednego testera z 300 µl każdej z dziesięciu ludzkich próbek moczu dodatnich pod kątem wirusa CMV i dziesięciu ludzkich próbek moczu ujemnych pod kątem wirusa CMV za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Kwas nukleinowy został również wyekstrahowany z tych samych próbek przy użyciu standardowej laboratoryjnej metody oczyszczania na potrzeby odniesienia. Wynikowe eluaty przeanalizowano poprzez amplifikację docelowego DNA głównego genu natychmiastowej odpowiedzi w teście qPCR. Wszystkie ludzkie próbki moczu ujemne pod kątem wirusa CMV i dziewięć z dziesięciu ludzkich próbek moczu dodatnich pod kątem wirusa CMV wykazało zgodność między wynikami uzyskanymi z kwasu nukleinowego wyekstrahowanego za pomocą laboratoryjnej metody referencyjnej ekstrakcji. Jedna próbka moczu potencjalnie dodatnia pod kątem wirusa CMV była nieprawidłowa między dwiema metodami oczyszczania z wynikiem ujemnym w zakresie systemu oczyszczania Maxwell® CSC Purification System i uzyskała słaby wynik dodatni (najniższa wartość C_q wynosząca 36,26 w przypadku czterech powtórzeń z dodatnim wynikiem z łącznie pięciu testowanych powtórzeń) za pomocą laboratoryjnej metody referencyjnej.

	System Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Laboratoryjna metoda referencyjna
Próbki ujemne pod kątem wirusa CMV	10/10	10/10
Próbki dodatnie pod kątem wirusa CMV	9/10	10/10

10. Ocena wydajności klinicznej (ciąg dalszy)

Tabela 7. Cytomegalowirus – ekstrakcja całkowitego kwasu nukleinowego z próbek osocza. Całkowity kwas nukleinowy został wyekstrahowany przez jednego testera z 300 µl każdej z dziesięciu ludzkich próbek osocza dodatnich pod kątem wirusa CMV i dziesięciu ludzkich próbek osocza ujemnych pod kątem wirusa CMV za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Kwas nukleinowy został również wyekstrahowany z tych samych próbek przy użyciu standardowej laboratoryjnej metody oczyszczania na potrzeby odniesienia. Wynikowe eluaty przeanalizowano poprzez amplifikację docelowego DNA głównego genu natychmiastowej odpowiedzi w teście qPCR. Kwas nukleinowy wyekstrahowany ze wszystkich ludzkich próbek osocza ujemnych i dodatnich pod kątem wirusa CMV za pomocą zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit przyniósł oczekiwany rezultat i wykazał zgodność między wynikami uzyskanymi z kwasu nukleinowego wyekstrahowanego przy użyciu laboratoryjnej metody referencyjnej ekstrakcji.

	System Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Laboratoryjna metoda referencyjna
Próbki ujemne pod kątem wirusa CMV	10/10	10/10
Próbki dodatnie pod kątem wirusa CMV	10/10	10/10

Zanieczyszczenie krzyżowe występujące w wyznaczonym środowisku użytkownika, który korzystał z zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit, zostało ocenione poprzez naprzemienne stosowanie kartridży Maxwell® CSC Cartridge zawierających ludzkie próbki osocza dodatnie i ujemne pod kątem wirusa CMV w tacy blatowej Maxwell® CSC 48 Instrument Deck Tray w ramach jednego przebiegu ekstrakcji całkowitego kwasu nukleinowego. Nie zaobserwowano zanieczyszczenia krzyżowego, ponieważ ujemne próbki dały ujemny wynik w teście qPCR pod kątem docelowego DNA wirusa CMV.

11. Tworzenie środowiska wolnego od rybonukleaz

Rybonukleazy są bardzo trudne do dezaktywowania. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć wprowadzenia aktywności RNazy do próbek całkowitego kwasu nukleinowego, które zawierają RNA w trakcie i po izolacji. Jest to szczególnie istotne, jeżeli materiał wyjściowy był trudny do zdobycia lub jest niemożliwy do zastąpienia. Poniższe uwagi mogą pomóc w zapobieganiu przypadkowej kontaminacji próbek RNazą.

1. Dwa najczęstsze źródła kontaminacji RNazą to dłonie użytkownika oraz bakterie lub pleśń, które mogą występować na cząsteczkach kurzu unoszących się w powietrzu. Aby zapobiec zanieczyszczeniu pochodzącego z tych źródeł, należy stosować technikę sterylną podczas obchodzenia się z odczynnikami dostarczonymi wraz z niniejszym systemem. Należy zawsze nosić rękawiczki. Należy zmieniać rękawiczki za każdym razem, gdy występuje podejrzenie, że mogło dojść do kontaktu z rybonukleazami.
2. W miarę możliwości do przenoszenia całkowitego kwasu nukleinowego, który zawiera RNA, należy stosować sterylne wyroby z tworzyw sztucznych. Materiały te są zwykle wolne od RNaz i nie wymagają zabiegów mających na celu ich dezaktywację.
3. Niesterylne wyroby ze szkła i z plastiku oraz komory do elektroforezy należy przed użyciem odkazić, aby upewnić się, że są wolne od RNaz. Wyżarzać szkło w temperaturze 200°C przez noc, a wyroby plastikowe dokładnie opłukać, używając 0,1 N NaOH, 1 mM EDTA, a następnie wodą wolną od RNazy. Można również użyć dostępnych na rynku produktów do usuwania RNaz, przestrzegając instrukcji producenta.

Uwaga: Komory do elektroforezy mogą być zanieczyszczone rybonukleazami, szczególnie RNazą A, które pochodzą z analizy próbek DNA. W miarę możliwości wyznaczyć nowe lub odkazone urządzenie wyłącznie do analizy RNA.

4. Roztwory niedostarczone wraz z systemem odkazać przez dodanie pirowęglanu dietylu (DEPC) do osiągnięcia stężenia 0,1% obj./obj. w wyciągu laboratoryjnym. Inkubować przez noc, mieszając w temperaturze pokojowej w wyciągu laboratoryjnym. Umieścić w autoklawie na 30 minut, aby usunąć wszelkie ślady DEPC.



Przestroga: DEPC jest środkiem podejrzewanym o właściwości rakotwórcze i należy go stosować wyłącznie w wyciągu laboratoryjnym odprowadzającym opary chemiczne. DEPC szybko reaguje z aminami i nie można go stosować do obróbki buforów Tris.

Uwaga: W przypadku wszystkich dalszych zastosowań ochrona próbek RNA przez RNazami jest niezbędna. Nosić czyste rękawiczki oraz stosować roztwory i próbówki wirówkowe wolne od RNaz.

12. Źródła

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*. Accessed November 2, 2022: www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html
4. Centers for Disease Control and Prevention. *Stool Specimens - Molecular Diagnosis*. Accessed November 2, 2022: www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/stool/moleculardx.html

13. Rozwiązywanie problemów

W przypadku pytań, na które nie można znaleźć odpowiedzi w niniejszym dokumencie, należy skontaktować się z lokalnym oddziałem firmy Promega lub jej dystrybutorem. Informacje kontaktowe są dostępne pod adresem:

www.promega.com. Wiadomości e-mail: **techserv@promega.com**

Objawy

Niższy odzysk kwasu nukleinowego patogenu, niż oczekiwano
(np. kontrole wewnętrzne zapewnione przez klienta)

Przyczyny i komentarze

Próbki początkowe zostały naruszone. Upewnić się, że próbki były pobierane, transportowane i przechowywane zgodnie z zalecanymi wytycznymi.

W przypadku wirusowych próbek RNA upewnić się, że procesy przygotowania próbki i konfiguracji testu odbywały się w warunkach wolnych od RNazy, z uwzględnieniem próbek i końcówek pipet wolnych od RNazy.

Etap przetwarzania nie był optymalny.

- Używać wyłącznie buforu lizującego dołączonego do tego zestawu.
- Niekompletne mieszanie może ograniczyć lizę. Wytrząsać próbkę z roztworem lizującym na wytrząsarce typu vortex zgodnie z zaleceniami.
- Niekompletne dodanie proteinazy w celu usunięcia kapsydów wirusowych i/lub białek z bakterii i pasożytów. Sprawdzić temperaturę bloku grzewczego lub łaźni wodnej i inkubować przez cały zalecany czas.
- Podczas pracy z patogenami utrudniającymi lizę (bakterie Gram-dodatnie lub pasożyty) w kale, można zastosować opcjonalny krok rozdrabniania kulkami ceramicznymi.
- Upewnij się, że 1-tioglicerol został dodany na potrzeby wstępnego przetwarzania próbki BAL lub próbki płucowej. Pominięcie 1-tioglicerolu może negatywnie wpłynąć na uzyski.
- Dodanie większej liczby próbek, niż jest to zalecane, może spowodować ograniczenie odzysku kwasu nukleinowego.

Sprawdzić, czy tłoczek został umieszczony w kartridżu.

Objawy

Przyczyny i komentarze

Niższy odzysk kwasu nukleinowego patogenu, niż oczekiwano
(np. kontrole wewnętrzne zapewnione przez klienta)

Problemy związane z przechowywaniem po oczyszczeniu.

- Usunąć eluaty i przechowywać w zalecanej temperaturze natychmiast po zakończeniu przebiegu w aparacie Maxwell® Instrument.
- Przed dalszymi oznaczeniami nie wolno wielokrotnie zamrażać i rozmrażać eluatów.

Kontrole wewnętrzne kwasu nukleinowego mniejsze niż 100 bp mogą zostać nieskutecznie oczyszczone przez system. Użytkownik jest odpowiedzialny za określenie wydajności każdej kontroli wewnętrznej.

Niewystarczająca amplifikacja

Przenoszenie cząsteczek paramagnetycznych może spowodować zakłócenie w zakresie reakcji amplifikacji. Usunąć cząsteczki z próbki do elucji poprzez wirowanie lub separację magnetyczną.

Dodano nieprawidłowy bufor do elucji. Należy używać wyłącznie wody buforu do elucji z zestawu Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.

Zanieczyszczenie krzyżowe

Używać świeżych końcówek pipet do każdej próbki, aby zapobiec zanieczyszczeniu między próbkami.

Unikać rozbryzgów podczas dodawania lizatów do kartridży. Kartridże można wyciągnąć ze stojaka na kartridże w celu dodania próbki, aby ograniczyć ryzyko zanieczyszczenia sąsiednich kartridży.

Urządzenie nie jest w stanie podnieść tłoczków

Upewnić się, że używany jest zestaw substancji chemicznych zgodny z urządzeniem Maxwell® CSC Instrument; a tłoczki do zestawów odczynników Maxwell® CSC Reagent Kit pasują do obsługiwanego urządzenia Maxwell® Instrument przeznaczonego do stosowania z tym zestawem.

Wszelkie poważne incydenty, które miały miejsce w związku z urządzeniem, które doprowadziły lub mogą prowadzić do śmierci lub poważnych obrażeń użytkownika lub pacjenta, należy niezwłocznie zgłaszać producentowi. Użytkownicy mający siedzibę w Unii Europejskiej powinni również zgłaszać wszelkie poważne incydenty właściwemu organowi państwa członkowskiego, w którym użytkownik i/lub pacjent ma siedzibę.

14. Powiązane produkty

Urządzenie i akcesoria

Produkt	Ilość	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument	1 szt.	AS6000
Maxwell® CSC 48 Instrument	1 szt.	AS8000
Maxwell® RSC/CSC Plungers, 50/zestaw	1 szt.	AS1331
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 szt.	SP6019
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 szt.	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 szt.	AS8402
ClickFit Microtube, 1,5 ml	1000 szt./zestaw	V4741

Zestawy odczynników Maxwell® CSC

Lista dostępnych zestawów do oczyszczania Maxwell® CSC Purification Kit znajduje się na poniższej stronie internetowej:
www.promega.com

^(a)Amerykańska publikacja patentowa nr 7,329,488 oraz południowokoreańska publikacja patentowa nr 100483684.

© 2022 Promega Corporation. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Maxwell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Promega Corporation.

ThinPrep jest zarejestrowanym znakiem towarowym firmy Hologic, Inc.

Produkty mogą być przedmiotem zgłoszonych bądź przyznanych patentów lub mogą podlegać pewnym ograniczeniom. Więcej informacji można znaleźć na naszej stronie internetowej. Wszystkie ceny i dane techniczne mogą ulec zmianie bez wcześniejszego powiadomienia.

Oświadczenia dotyczące produktów mogą ulec zmianie. Aby uzyskać aktualne informacje na temat produktów firmy Promega, należy skontaktować się z działem Promega Technical Services lub zapoznać się z katalogiem produktów firmy Promega dostępnym w Internecie.