

MANUAL TÉCNICO

Maxwell[®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Instruções de utilização do produto
AS1860

Atenção: manuseie os cartuchos com cuidado; as extremidades do selo podem ser cortantes.



INSTRUÇÕES DE
UTILIZAÇÃO DO PRODUTO
AS1860



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany



Maxwell[®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Toda a literatura técnica está disponível na Internet em: www.promega.com/protocols/
 Visite o Website para verificar se está a utilizar a versão mais atual deste Manual técnico.
 Se tiver quaisquer dúvidas sobre a utilização deste sistema, envie um e-mail para o nosso centro de assistência,
 Promega Technical Services: techserv@promega.com

1. Descrição	2
2. Componentes do produto e condições de armazenamento	3
3. Finalidade prevista/Utilização prevista do produto	5
4. Limitações de utilização do produto	5
5. Antes de começar	6
6. Preparação da amostra	7
6.A. Preparar amostras de fezes para utilizar com o Maxwell [®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	7
6.B. Preparar amostras de BAL ou expectoração para utilizar com o Maxwell [®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	8
6.C. Preparar amostras de urina para utilizar com o Maxwell [®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	9
6.D. Preparar amostras de plasma, virais em meio de transporte ou meio Pap para utilizar com o Maxwell [®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	10
6.E. Preparar o Maxwell [®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge	10
7. Configuração e execução do Maxwell [®] Instrument	12
8. Armazenar o ácido nucleico eluído	14
9. Avaliação do desempenho analítico	15
9.A. Quantidade, qualidade e capacidade de amplificação do DNA	15
9.B. Quantidade, qualidade e capacidade de amplificação do RNA	16
9.C. Reprodutibilidade	18
9.D. Inibição da amplificação por causa de substâncias interferentes	21
9.E. Contaminação cruzada	25
10. Avaliação do desempenho clínico	25
11. Criar um ambiente livre de ribonucleases	29
12. Referências	29
13. Resolução de problemas	30
14. Produtos relacionados	31

O Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit só está disponível em determinados países.

1. Descrição

O Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit^(a) é utilizado com os Maxwell® Instruments especificados na Tabela 1 para fornecer um método fácil para uma preparação das amostras eficiente e automática e purificação do ácido nucleico patogénico total. Os Maxwell® CSC Instruments são concebidos para serem utilizados com cartuchos de reagentes pré-dispensados e procedimentos de purificação pré-programados, proporcionando uma maior simplicidade e comodidade. O Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit foi concebido para realizar a extração automática de ácido nucleico total bacteriano, viral e de parasitas das seguintes amostras biológicas humanas: fezes, expectoração, lavagem broncoalveolar, urina, plasma, zaragoas nasofaríngeas e zaragoas cervicais em meio de transporte. O método Maxwell® Instrument do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit consegue processar desde um até o número máximo de amostras do Maxwell® Instrument em cerca de 40 minutos. O volume de eluição baixo de 100 µl resulta num ácido nucleico purificado concentrado para aplicações a jusante, como PCR quantitativo (qPCR) ou RT-PCR quantitativo (RT-qPCR). Após um breve passo de pré-processamento de lise, a amostra é adicionada ao Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge e o restante processamento é completamente automático.

Tabela 1. Instrumentos suportados.

Instrumento	Cat.#	Manual técnico
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

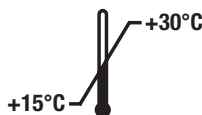
Princípio do Método

O Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit purifica as amostras utilizando partículas paramagnéticas, que fornecem uma fase sólida móvel para otimizar a captura, a lavagem e a purificação de amostras de ácido nucleico. Os Maxwell® Instruments são instrumentos de manuseamento de partículas magnéticas que ligam de maneira eficiente os ácidos nucleicos à partícula paramagnética no primeiro poço de um cartucho pré-cheio. As amostras são processadas através de uma série de lavagens antes de o ácido nucleico total ser eluído.

2. Componentes do produto e condições de armazenamento

PRODUTO	TAMANHO	CAT.#
Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	48 preparações	AS1860

Para utilização em diagnóstico in vitro. Exclusivamente para utilização profissional. Suficiente para 48 isolamentos. Os cartuchos destinam-se apenas a uma única utilização.



Inclui:

- 150 ml Tampão de diluição (ST1)
- 900 µl 1-tioglicerol
- 20 ml Tampão de lise
- 2 × 1 ml Solução de proteinase K (PK)
- 50 Êmbolos CSC/RSC
- 48 Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ)
- 50 Tubos de eluição (0,5 ml)
- 20 ml Tampão de eluição

Condições de armazenamento: Após a recepção, remova o 1-tioglicerol e armazene-o entre +2 °C a +10 °C. Armazene os restantes componentes do kit à temperatura ambiente (+15 °C a +30 °C).



Informação de segurança: Os cartuchos contêm etanol, isopropanol e hidrocloreto de guanidina. O etanol e o isopropanol devem ser considerados como inflamáveis, nocivos e irritantes. O hidrocloreto de guanidina deve ser considerado como tóxico, nocivo e irritante. Consulte a Ficha de dados de segurança (SDS) para obter informações detalhadas sobre segurança.



Os cartuchos foram concebidos para utilização com substâncias potencialmente infecciosas. Deve ser utilizada proteção adequada (por exemplo, luvas e óculos de proteção) ao manusearem substâncias infecciosas. Cumpra as suas diretrizes institucionais quanto ao manuseamento e à eliminação de substâncias infecciosas quando utilizadas com este sistema.



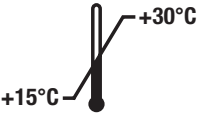













Atenção: Manuseie os cartuchos com cuidado; as extremidades do selo podem ser cortantes.

Informação adicional: Os componentes do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit são qualificados e testados de acordo com o controlo de qualidade para trabalharem em conjunto. **Não** misture componentes de kits com lotes de kits diferentes. Utilize apenas os componentes fornecidos no kit. Não utilize os cartuchos se o selo no cartucho não estiver intacto no momento da recepção. Para obter informações de segurança adicionais, consulte a Ficha de dados de segurança, disponível em: www.promega.com

2. Componentes do produto e condições de armazenamento (continuação)

Legenda dos símbolos

Símbolo	Explicação	Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro		Não reutilizar
	Conservar entre +15 °C a +30 °C.		Fabricante
	Atenção		Inflamável
	Risco de saúde		Conteúdo suficiente para "n" testes
	Aviso. Perigo de entalamento.		Aviso. Riscos biológicos.
	Número de lote		Número de catálogo
	Conformidade Europeia		Representante autorizado

3. Finalidade prevista/Utilização prevista do produto

O Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit destina-se a ser utilizado, em conjunto com os Maxwell® CSC instruments e com o método Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid, como um dispositivo médico para diagnóstico in vitro (IVD) para a realização do isolamento automático de ácido nucleico total bacteriano, viral e de parasitas das seguintes amostras biológicas humanas: fezes, expectoração, lavagem broncoalveolar, zaragoas nasofaríngeas em meio de transporte, zaragoas cervicais em meio de transporte, urina, plasma. O ácido nucleico total purificado é adequado para utilização em ensaios de diagnóstico in vitro com base na amplificação.

O Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit destina-se a ser utilizado a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C. A utilização fora deste intervalo de temperatura pode dar origem a resultados subótimos.

O Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit destina-se exclusivamente a utilização profissional. Os resultados do diagnóstico obtidos através da utilização de ácido nucleico total purificado com este sistema devem ser interpretados em conjunto com outros dados clínicos ou laboratoriais.

4. Limitações de utilização do produto

O desempenho do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit foi avaliado para os seguintes patógenos utilizando os tipos de amostras listados:

- Bacterianas: fezes, expectoração, lavagem broncoalveolar, zaragoas nasofaríngeas em meio de transporte, zaragoas cervicais em meio de transporte, urina.
- De parasitas: fezes, zaragoas cervicais em meio de transporte, urina.
- Virais: fezes, expectoração, lavagem broncoalveolar, zaragoas nasofaríngeas em meio de transporte, zaragoas cervicais em meio de transporte, urina, plasma.

O Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit não se destina a utilização com amostras não humanas.

Será necessário incluir os controlos apropriados em todas as aplicações de diagnóstico a jusante que utilizem ácido nucleico total purificado com o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. O utilizador é responsável por validar as características do desempenho necessárias para aplicações diagnósticas a jusante.

5. Antes de começar

Materiais que devem ser fornecidos pelo utilizador

- Tubos de 1,5–2,0 ml para incubar amostras (por ex., ClickFit Microtube, 1,5 ml [Cat.# V4741]; recomendados para impedir a abertura da tampa durante o aquecimento)
- Tubo cónico de 15 ml ou 50 ml para preparar a solução de lise
- Agitador vortex de bancada
- Pipetadores e pontas de pipeta para transferência de amostras para cartuchos de reagentes pré-cheios
- Placa térmica ou banho de água a 56 °C
- Placa térmica configurada para 95 °C para amostras de expectoração e BAL
- **opcional:** 1X Tampão fosfato-salino (PBS) para diluir amostras de BAL e expectoração
- **opcional:** centrífugadora para pré-processamento de amostras de urina
- **opcional:** esferas de zircónio de 0,1–0,5 mm para pré-processamento de amostras de fezes (por ex., esferas de agitação ZR, Zymo [Cat.# S6012-50])
- Tubos para amostras de fezes, expectoração, lavagem broncoalveolar (BAL), meio de transporte viral (VTM), meio Pap, plasma, urina.



Recomenda-se a observância de precauções relativas a patógenos no sangue no manuseamento de amostras derivadas de humanos.

No caso de amostras de plasma, colha o sangue em tubos com anticoagulante EDTA. Evite utilizar tubos de colheita de sangue contendo heparina porque a heparina consegue inibir amplificações a jusante.

As recomendações gerais a seguir apresentadas destinam-se à preparação e armazenamento de amostras (de referências 1-4):

1. Separe o plasma das células no prazo de 1 hora após a colheita do sangue com centrifugação a 1500 × g durante 20 minutos a 25 °C e, em seguida, transferir a camada de plasma para um tubo limpo. Guarde as amostras de plasma a 2–8 °C durante um máximo de 24 horas, ou congele as amostras que não sejam processadas no prazo de 24 horas a –20 °C durante um máximo de 5 dias.
2. No caso de zaragoas em VTM, use apenas zaragoas de fibra sintética com hastes plásticas. Não use zaragoas de alginato de cálcio ou zaragoas com hastes de madeira, visto que podem conter substâncias que inibem os testes de PCR. Coloque as zaragoas imediatamente em tubos estéreis contendo 2–3 ml do meio de transporte viral. Guarde o VTM e amostras a 2–8 °C durante até 72 horas, ou congele as amostras a –70 °C. Evite a realização de ciclos congelação-descongelação repetidos e não guarde as amostras num congelador sem gelo. As condições específicas de colheita e armazenamento podem variar, dependendo do vírus isolado.
3. Guarde as amostras de urina frescas a 4 °C durante até 24 horas antes do processamento. No caso de armazenamento a longo prazo, adicione EDTA a uma concentração final de 20 mM. Para evitar a lise celular, guarde urina estabilizada a 4 °C. Para evitar a lise celular, a urina não deve ser congelada. Se a urina for congelada e descongelada, um precipitado pode tornar-se visível. A mistura e/ou aquecimento da amostra deve resolubilizar o precipitado. Evite centrifugar a amostra para remover o precipitado porque isto pode remover células patogénicas intactas.

4. Guarde a BAL e amostras de expectoração a 2–8 °C durante até 72 horas, ou congele as amostras a –70 °C. Evite a realização de ciclos congelamento-descongelamento repetidos e não guarde as amostras num congelador sem gelo. As condições específicas de colheita e armazenamento podem variar, dependendo do patógeno isolado.
5. As amostras de fezes devem ser congeladas a –20 °C a –80 °C antes de processar.

6. Preparação da amostra

6.A. Preparar amostras de fezes para utilizar com o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

1. Pese 100–500 mg de amostra fecal num tubo de microcentrifugação de 2 ml com tampa de rosca.
2. Adicione 1 ml de tampão de diluição (ST1) para ressuspender a amostra. Agite por rotação durante 30 segundos a 1 minuto. Utilize pontas de pipeta novas para cada amostra para evitar contaminação entre as amostras.
3. Centrifugue a amostra a 1000 × g durante 1 minuto à temperatura ambiente.
4. Transfira o sobrenadante para o tubo com o tamanho apropriado e meça o volume.
5. Adicione 2X o volume do tampão de diluição (ST1) a uma diluição 1:2 da amostra de fezes [por ex., 1 ml de sobrenadante de fezes + 2 ml de tampão de diluição (ST1)]. Utilize esta diluição da amostra de fezes para purificações de DNA.

Nota: para extrair RNA viral, dilua a amostra de fezes adicionalmente para 1:8 em Nuclease-Free Water (por ex., 100 µl da diluição 1:2 da amostra de fezes + 700 µl de Nuclease-Free Water). Armazene a amostra à temperatura ambiente até estar pronta para processamento.

Método opcional de agitação de esferas para extrair DNA de patógenos de lise difícil nas amostras de fezes

Nota: para extrair os ácidos nucleicos de patógenos de lise difícil, como bactérias Gram-positivas ou protozoários nas amostras de fezes, um passo opcional de agitação de esferas pode ser realizado. Esta homogeneização adicional pode aumentar a colheita de purificação de ácido nucleico se o método de lise padrão for insuficiente.

- a. Transfira 600 µl para 1 ml de amostra de fezes diluída para um tubo de 2 ml contendo esferas e feche o tubo.
 - b. Coloque os tubos num agitador tipo Vórtex ou equivalente e agite por rotação ou agite por esferas à velocidade máxima durante 10 minutos.
 - c. Centrifugue os tubos numa microcentrifugadora durante 1 minuto à velocidade completa para separar as esferas da amostra.
6. Adicione 300 µl do lisato de fezes a um novo tubo de 1,5 ml.
 7. Adicione 300 µl de tampão de lise e misture por rotação durante 10 segundos.
 8. Adicione 30 µl de solução de proteinase K e agite por rotação brevemente para misturar.
 9. Incube a 56 °C durante 20 minutos.
 10. Prossiga para a preparação do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (Secção 6.E).



6.B. Preparar amostras de BAL ou expectoração para utilizar com o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

1. Se congelada, descongele a amostra de BAL ou expectoração à temperatura ambiente.
Nota: para reduzir a viscosidade das amostras de BAL e expectoração, dilua num volume igual de 1X PBS, homogeneize mecanicamente ou dilua e homogeneize antes de processar.
2. Para cada amostra, adicione 100–300 µl a um tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml. (Recomendamos a utilização de uma pipeta de diâmetro largo.) Utilize pontas de pipeta novas para cada amostra para evitar contaminação entre as amostras.
3. Adicione 12 µl de 1-tioglicerol e pipete para misturar.
Nota: pipete lentamente porque a solução é viscosa.
4. Adicione 300 µl de tampão de lise e misture por rotação durante 10 segundos.
5. Incube a 95 °C durante 5 minutos. Arrefeça na bancada durante 2 minutos.
6. Adicione 30 µl de solução de proteinase K e agite por rotação brevemente para misturar.
7. Incube a 56 °C durante 20 minutos.
8. Prossiga para a preparação do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (Secção 6.E).

6.C. Preparar amostras de urina para utilizar com o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Preparar volumes de amostra pequenos (300 µl de urina):

1. Agite por rotação brevemente a amostra de urina para ressuspender quaisquer células assentes.
2. Para cada amostra, adicione 300 µl de urina a um tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml. Utilize pontas de pipeta novas para cada amostra para evitar contaminação entre as amostras.
3. Adicione 300 µl de tampão de lise e misture por rotação durante 10 segundos.
4. Adicione 30 µl de solução de proteinase K e agite por rotação brevemente para misturar.
5. Incube a 56 °C durante 20 minutos.
6. Prossiga para a preparação do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (Secção 6.E).

Preparar volumes de amostra grandes (30 ml de urina):

1. Agite por rotação brevemente a amostra de urina para ressuspender quaisquer células assentes.
2. Para cada amostra, adicione 30 ml de urina a um tubo de 50 ml. Utilize pontas de pipeta novas para cada amostra para evitar contaminação entre as amostras.
3. Centrifugue a amostra de urina a 2000 × g durante 10 minutos.
4. Remova o sobrenadante com uma pipeta, tendo cuidado para não perturbar o precipitado.
Nota: pode deixar algum líquido para preservar a integridade do precipitado (até 300 µl).
5. Adicione 300 µl de tampão de lise ao tubo e ressuspenda o precipitado pipetando.
6. Transfira o lisato para um tubo de 1,5 ml.
7. Adicione 30 µl de solução de proteinase K e agite por rotação brevemente para misturar.
8. Incube a 56 °C durante 20 minutos.
9. Prossiga para a preparação do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (Secção 6.E).

6.D. Preparar amostras de plasma, virais em meio de transporte ou meio Pap para utilizar com o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

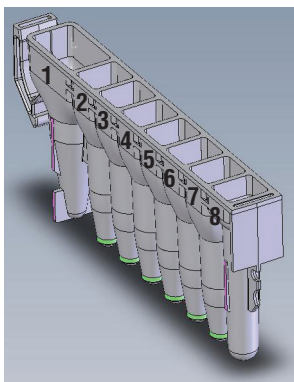
1. Se congelado, descongele o plasma ou meio à temperatura ambiente e agite por rotação brevemente para misturar.
2. Para cada amostra, adicione 300 µl de plasma ou meio contendo a amostra biológica a um tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml. Utilize pontas de pipeta novas para cada amostra para evitar contaminação entre as amostras.
3. Adicione 300 µl de tampão de lise e misture por rotação durante 10 segundos.
4. Adicione 30 µl de solução de proteinase K e agite por rotação brevemente para misturar.
5. Incube a 56 °C durante 20 minutos.
6. Prossiga para a preparação do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (Secção 6.E).

6.E. Preparar o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge

1. Troque de luvas antes de manusear os cartuchos, êmbolos e tubos de eluição (0,5 ml). Coloque os cartuchos a utilizar no(s) tabuleiro(s) da plataforma com o poço n.º 1 (o poço maior do cartucho) virado na direção contrária aos tubos de eluição. Pressione para baixo o cartucho de forma a encaixá-lo na respetiva posição. Remova cuidadosamente o selo, para remover toda a película plástica da parte superior do cartucho. Certifique-se de que remove a totalidade da película aderente vedante e eventuais resíduos de adesivo, antes de colocar os cartuchos no instrumento.
2. Coloque um êmbolo no poço n.º 8 de cada cartucho.
3. Coloque um tubo de eluição (0,5 ml) vazio na posição do tubo de eluição de cada cartucho no(s) tabuleiro(s) da plataforma.
4. Adicione 100 µl de tampão de eluição ao fundo de cada tubo de eluição.
5. Gira brevemente os lisatos da amostra numa microcentrifugadora para recolher o líquido no fundo do tubo. Transfira o lisato da amostra para o poço n.º 1 (o poço maior) do cartucho. Não adicione nada exceto o lisato da amostra ao cartucho.
6. Prossiga para a Secção 7, Configuração e execução do Maxwell® Instrument.

Notas:

- a. Os pingos de reagente ou de amostra retidos em qualquer parte do tabuleiro da plataforma deverão ser limpos com uma solução de água e detergente, seguida de um spray ou toalhete bactericida e, em seguida, água. Não utilize lixívia nos componentes do instrumento.
- b. Utilize apenas os tubos de eluição de 0,5 ml fornecidos com o kit. Outros tubos poderão ser incompatíveis com o Maxwell® Instrument.



Adições do utilizador aos poços

1. Lisato da amostra
8. Êmbolo CSC/RSC

Figura 1. Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge. A amostra pré-processada é adicionada ao poço n.º 1 e um êmbolo é adicionado ao poço n.º 8.



Figura 2. Instalação e configuração do(s) tabuleiro(s) de plataforma. O tampão de eluição é adicionado aos tubos de eluição, conforme apresentado. Os êmbolos encontra-se no poço n.º 8 do cartucho.

7. Configuração e execução do Maxwell® Instrument

Consulte o Manual Técnico específico do seu Maxwell® Instrument (ver Tabela 1) para obter informações detalhadas.

1. Ligue o Maxwell® Instrument e o Tablet PC. Inicie a sessão no Tablet PC e inicie o software Maxwell® IVD Mode tocando duas vezes no ícone no ambiente de trabalho. O instrumento arranca, executa uma autoteste e coloca todas as peças móveis na respetiva posição inicial.
2. Toque em **Iniciar** para iniciar o processo de execução de um método.
3. Leia ou introduza o código de barras do método no canto superior direito da etiqueta do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit para selecionar automaticamente o método a executar (Figura 3).

Nota: o código de barras do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit é necessário para a purificação nos Maxwell® CSC Instruments. A etiqueta do kit contém dois códigos de barras. O código de barras do método é indicado na Figura 3 abaixo. Contacte o nosso centro de assistência, Promega Technical Services, caso o código de barras não possa ser lido.



Figura 3. Etiqueta do kit que indica o código de barras do método a ler. O código de barras a ler para iniciar uma purificação é apresentado na caixa vermelha, na parte superior direita da etiqueta do kit.

4. No ecrã de "Configuração do cartucho", toque nas posições do cartucho para selecionar ou anular a seleção de qualquer posição a utilizar na execução da extração. Introduza qualquer informação de acompanhamento de amostra e pressione o botão **Prosseguir** para continuar.

Nota: quando estiver a usar os Maxwell® Instruments de 48 posições, prima o botão **Anterior** e **Posterior** para marcar ou desmarcar as posições dos cartuchos em cada tabuleiro de plataforma.

5. Depois de abrir a porta, confirme que todos os itens da Lista de Verificação de Extração foram realizados. Verifique se as amostras foram adicionadas ao poço n.º 1 dos cartuchos, se os cartuchos estão carregados no instrumento, se os tubos de eluição destapados estão presentes com tampão de eluição e se os êmbolos estão colocados no poço n.º 8. Transfira o(s) tabuleiro(s) da plataforma que contém os cartuchos preparados para a plataforma do Maxwell® Instrument.

Inserir o Tabuleiro da plataforma Maxwell®: segure o tabuleiro da plataforma de ambos os lados para evitar que os cartuchos saiam dos respetivos encaixes no tabuleiro da plataforma. Certifique-se de que o tabuleiro da plataforma é colocado no Maxwell® Instrument com os tubos de eluição próximos da porta. Posicione o ângulo da parte posterior do tabuleiro da plataforma para baixo e coloque no instrumento de maneira a que a parte posterior do tabuleiro da plataforma fique apoiada na parte posterior da plataforma do instrumento. Pressione a parte dianteira do tabuleiro da plataforma para baixo para assentar o tabuleiro da plataforma na plataforma de instrumentos. Se tiver dificuldade em encaixar o tabuleiro da plataforma na plataforma, verifique se o tabuleiro da plataforma está na orientação correta. Assegure-se de que o tabuleiro da plataforma se encontra nivelado com a plataforma de instrumentos e totalmente assente.

Nota: verifique o identificador no(s) tabuleiro(s) da plataforma Maxwell® de 24 posições para determinar se devem ser colocadas na frente ou atrás do instrumento.

6. Confirme se todos os pré-processamentos indicados foram realizados e toque em Iniciar para fechar a porta do instrumento e iniciar o processamento.

Nota: ao utilizar o Maxwell® Instrument de 48 posições, se o Sistema de Visão tiver sido ativado, o(s) tabuleiro(s) da plataforma serão lidos à medida que a porta se retrai. Quaisquer erros na configuração do tabuleiro de plataforma (por ex., êmbolos não estão presentes no poço n.º 8, tubos de eluição não presentes e abertos) irão causar o software regressar ao ecrã "Configuração do cartucho", e as posições problemáticas serão marcadas com um ponto de exclamação num círculo vermelho. Toque no ponto de exclamação para obter uma descrição do erro e resolver todos os estados de erro. Toque no botão **Iniciar** novamente para repetir a leitura do tabuleiro da plataforma e iniciar a extração.



Aviso: perigo de entalamento.

O Maxwell® Instrument irá iniciar imediatamente a execução de purificação. O ecrã irá apresentar informações incluindo o utilizador que iniciou a execução, o atual passo do método que está a ser realizado e o tempo restante aproximado da execução.

Notas:

- Toque no botão **Abortar** para abandonar a execução. Todas as amostras de uma execução abortada serão perdidas.
- Se a execução for abandonada antes da conclusão, poderá ser-lhe pedido para verificar se os êmbolos ainda estão carregados na barra do êmbolo. Se os êmbolos estão presentes na barra do êmbolo, deve desempenhar uma **Limpeza** quando pedido. Se os êmbolos não estão presentes na barra do êmbolo, pode escolher não realizar a **Limpeza**. As amostras serão perdidas. Não tente voltar a purificar as amostras se uma execução do instrumento tiver sido abortada.



7. Configuração e execução do Maxwell® Instrument (continuação)

7. Siga as instruções apresentadas no ecrã no final do método para abrir a porta. Verifique se os êmbolos se encontram no poço n.º 8 do cartucho, no final da execução. Se os êmbolos não forem removidos da barra de êmbolo, siga as instruções do Manual Técnico adequadas do Maxwell® Instrument (Tabela 1) para desempenhar um processo de **Limpeza** para tentar descarregar os êmbolos.
8. Remova o(s) tabuleiro(s) de plataforma do instrumento. Retire os tubos de eluição contendo ácido nucleico patogénico total e feche os tubos. Se estiver presentes partículas paramagnéticas nos tubos de eluição, centrifugue a $10.000-20.000 \times g$ durante 30 segundos até 1 minuto e, em seguida, transfira o sobrenadante para os tubos de armazenamento (não fornecidos). Após a conclusão da execução, será apresentado o relatório de execução da extração. No ecrã "Vista de Relatório", pode imprimir ou exportar este relatório ou ambos.
9. Remova os cartuchos e os êmbolos do tabuleiro de plataforma e elimine os resíduos perigosos cumprindo as diretrizes recomendadas da sua instituição. Não reutilize os cartuchos de reagentes, êmbolos ou tubos de eluição.

Nota: certifique-se de que as amostras foram removidas antes de realizar qualquer tratamento por UV necessário do instrumento, para evitar danificar o ácido nucleico.

8. Armazenar o ácido nucleico eluído

Caso as amostras não sejam processadas imediatamente, guarde o DNA eluído do patogéneo em gelo, ou a 4 °C até um máximo de 24 horas. No caso de um tempo de armazenamento superior, congele a -20 °C ou -70 °C. A estabilidade do RNA é inferior, devendo ser preferencialmente testada em ensaios a jusante, imediatamente após o isolamento. Se efetuar os testes logo após o isolamento, armazene o RNA do patogéneo em gelo ou a 4°C. Em alternativa, guarde o RNA do patogéneo a -70 °C. Consulte as instruções das aplicações a jusante para obter recomendações específicas do armazenamento e manuseamento das amostras.

9. Avaliação do desempenho analítico

A avaliação do desempenho analítico do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit foi realizada utilizando vários tipos de amostra fortificados com patógenos inativos processados nos Maxwell® CSC and Maxwell® CSC 48 Instruments.

9.A. Quantidade, qualidade e capacidade de amplificação do DNA

O ácido nucleico total foi extraído de replicados de 300 µl de uma suspensão de fezes, cada fortificado com aproximadamente $2,5 \times 10^4$ cópias de *Giardia lamblia* inativada utilizando o método padrão ou o método de pré-processamento de agitação de esferas. O ácido nucleico total foi eluído utilizando 100 µl de tampão de eluição. Foram utilizados cinco microlitros de cada eluato sem diluição num ensaio de qPCR para amplificar um alvo de DNA específico para *G. lamblia*. O C_q médio gerado utilizando o método padrão era de 34,39 ciclos. O C_q médio gerado utilizando o método de agitação de esferas era de 29,35 ciclos.

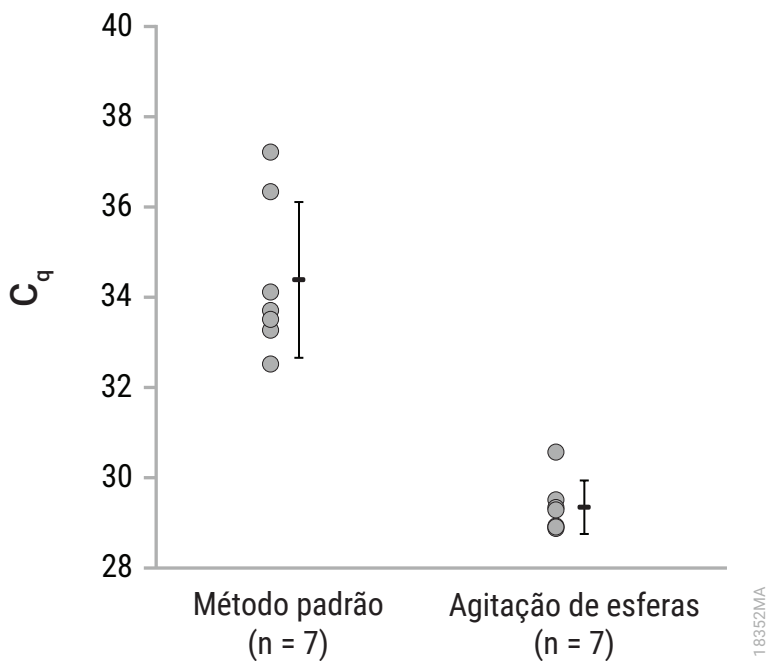


Figura 4. Amplificação da sequência de alvo de DNA de *G. lamblia* utilizando o ácido nucleico total extraído de amostras de fezes utilizando o método padrão versus o método de agitação de esferas.

9.B. Quantidade, qualidade e capacidade de amplificação do RNA

Para demonstrar que o desempenho do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit é semelhante quando utilizado com o Maxwell® CSC ou o Maxwell® CSC 48 Instrument, o ácido nucleico total foi extraído utilizando o kit com ambos os instrumentos de oito replicados de 300 µl de amostras de expectoração fortificados com 1×10^4 cópias do vírus SARS CoV-2 inativado. O ácido nucleico total foi eluído em 100 µl de tampão de eluição, e 5 µl de cada eluato foi utilizado num ensaio de RT-qPCR para amplificar uma sequência de RNA alvo específica do SARS CoV-2. A comparação dos resultados de RT-qPCR obtidos do ácido nucleico total extraído utilizando o Maxwell® CSC Instrument e o Maxwell® CSC 48 Instrument revelou que todos os valores de $|\Delta C_q|$ eram $\leq 0,59$ ciclos, com um $|\Delta C_q|$ médio de 0,16 ciclos.

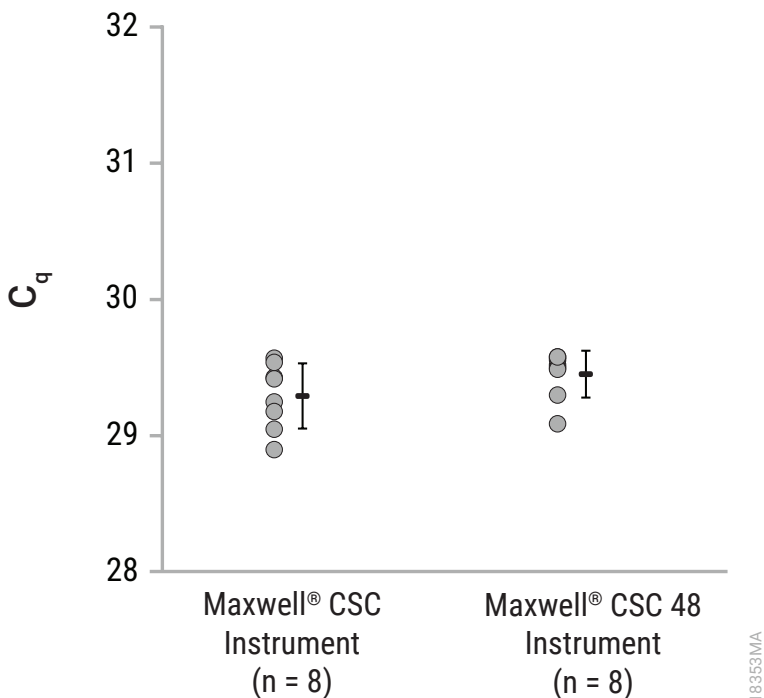


Figura 5. A capacidade de amplificação do ácido nucleico total extraído de amostras de expectoração contendo SARS CoV-2 utilizando o Maxwell® CSC ou o Maxwell® CSC 48 Instrument.

O ácido nucleico total foi purificado em paralelo com 300 µl bem como 100 µl de amostras de lavagem broncoalveolar (BAL), cada fortificada com 1×10^4 cópias do vírus SARS CoV-2 inativado para avaliar o efeito de diferentes quantidades da matriz da amostra sobre a capacidade de amplificação. O ácido nucleico total foi eluído em 100 µl de tampão de eluição, e 5 µl de cada eluato sem diluição foi utilizado num ensaio de RT-qPCR para amplificar uma sequência de RNA alvo específica do SARS CoV-2. Todos os valores de C_q do ácido nucleico total purificado a partir de 300 µl de expectoração eram de $\leq 30,86$ ciclos, com um C_q médio de 30,56 ciclos. Todos os valores de C_q do ácido nucleico total purificado a partir de 100 µl de BAL eram de $\leq 29,93$ ciclos, com um C_q médio de 29,74 ciclos.

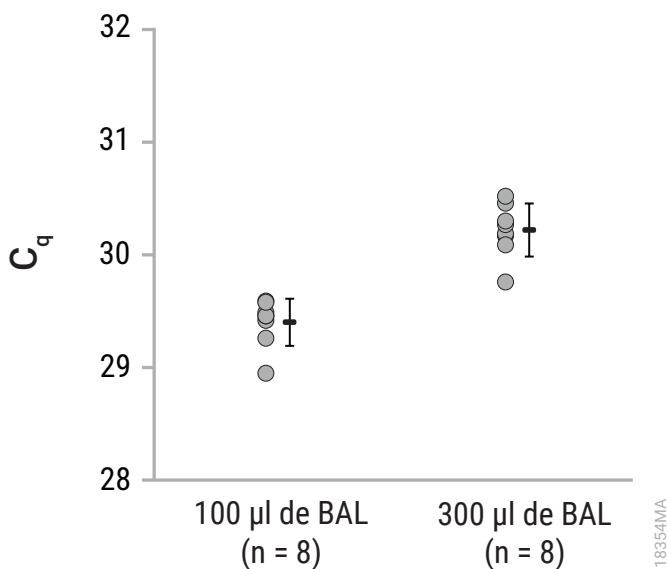


Figura 6. A amplificação da sequência de RNA alvo do SARS CoV-2 utilizando o ácido nucleico total extraído de diferentes volumes de introdução da amostra.

9.C. Reprodutibilidade

Para avaliar a reprodutibilidade da extração do ácido nucleico total utilizando o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit entre os utilizadores, três utilizadores pré-processaram cada cinco replicados de 300 µl do meio de transporte universal (UTM) fortificado com *Bordetella pertussis*, e ácido nucleico total extraído na mesma execução do Maxwell® CSC Instrument. Os ácidos nucleicos foram eluídos em 100 µl de tampão de eluição. Foram utilizados cinco microlitros do eluato sem diluição num ensaio de qPCR para amplificar uma sequência do DNA alvo específica da *B. pertussis*, e o C_q médio e o desvio padrão foram calculados. A purificação do ácido nucleico total era reprodutível, com desvios padrão de 0,31 ciclos (Utilizador 1), 0,23 ciclos (Utilizador 2) e 0,40 ciclos (Utilizador 3). Nos três utilizadores, o desvio padrão era de 0,32 ciclos.

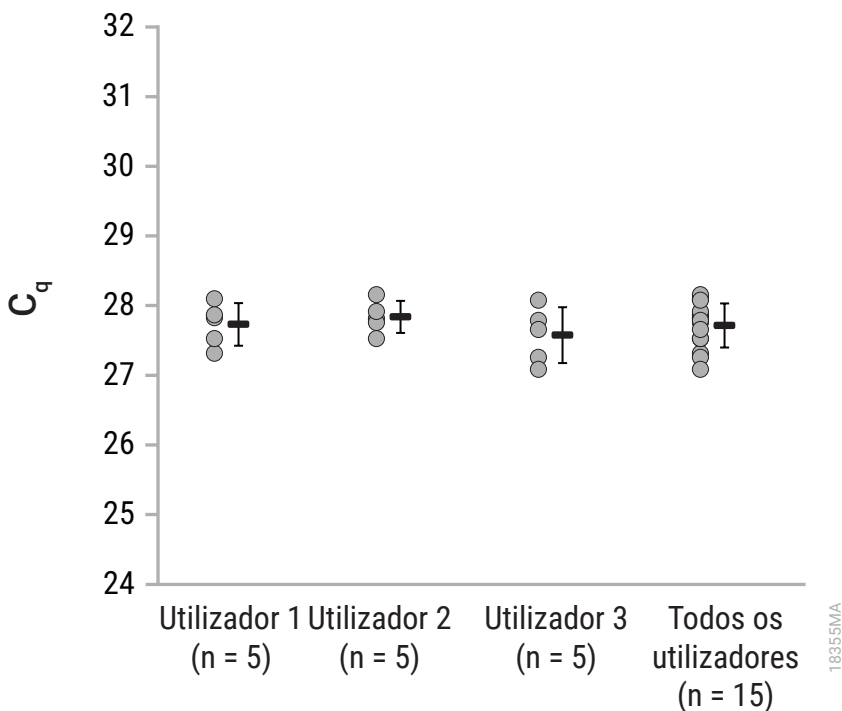


Figura 7. Reprodutibilidade da extração do ácido nucleico total entre os três utilizadores.

Para avaliar a reprodutibilidade da extração do ácido nucleico total entre diferentes execuções de extração, um único utilizador realizou três execuções diferentes de extração do ácido nucleico total cada com oito replicados de 300 µl do UTM fortificados com *B. pertussis* utilizando o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit com os Maxwell® CSC Instruments. O ácido nucleico total foi eluído em 100 µl de tampão de eluição durante cada uma das três execuções separadas. Foram utilizados cinco microlitros do eluato sem diluição num ensaio de qPCR para amplificar uma sequência do DNA alvo específica de *B. pertussis*, e o C_q médio e o desvio padrão foram calculados. A purificação do ácido nucleico total era reprodutível, com desvios padrão de 0,25 ciclos (Execução 1), 0,40 ciclos (Execução 2) e 0,22 ciclos (Execução 3). Nas três execuções, o desvio padrão era de 0,43 ciclos.

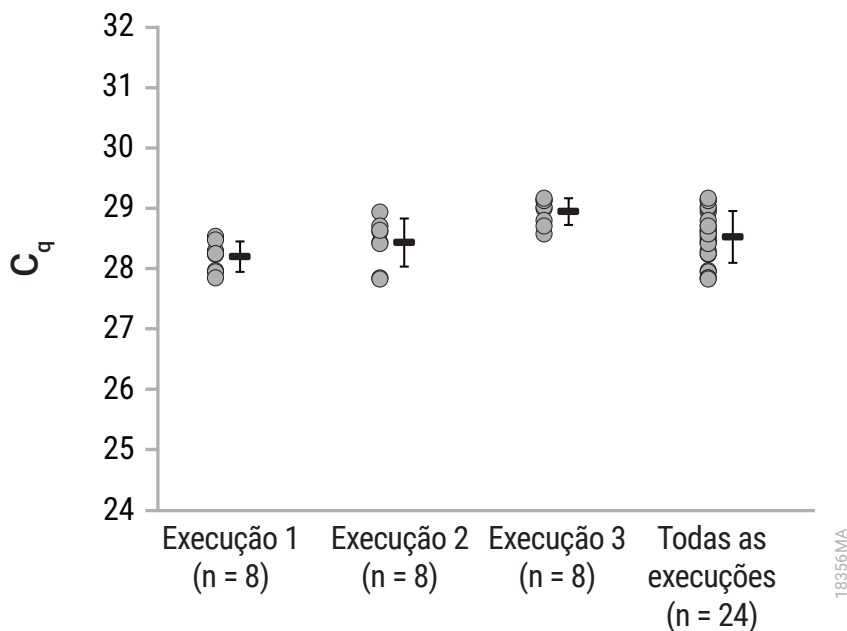


Figura 8. Reprodutibilidade da extração do ácido nucleico total entre as três execuções de extração realizadas por um único utilizador.

9.C. Reprodutibilidade (continuação)

Para avaliar a reprodutibilidade da extração do ácido nucleico total entre diferentes lotes do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit, o ácido nucleico total foi purificado através de replicados de 300 µl de UTM fortificados com *B. pertussis* utilizando três lotes de kits, cada contendo lotes únicos de reagentes críticos. Cada eluato sem diluição foi utilizado num ensaio de qPCR para amplificar uma sequência do DNA alvo específica da *B. pertussis*, e o C_q médio e o desvio padrão foram calculados. O desvio padrão dos valores de C_q gerado utilizando o Lote 1 era de 0,38 ciclos; Lote 2 era de 0,30 ciclos; e o Lote 3 era de 0,35 ciclos. O desvio padrão do C_q em todos os três lotes era de 0,34 ciclos.

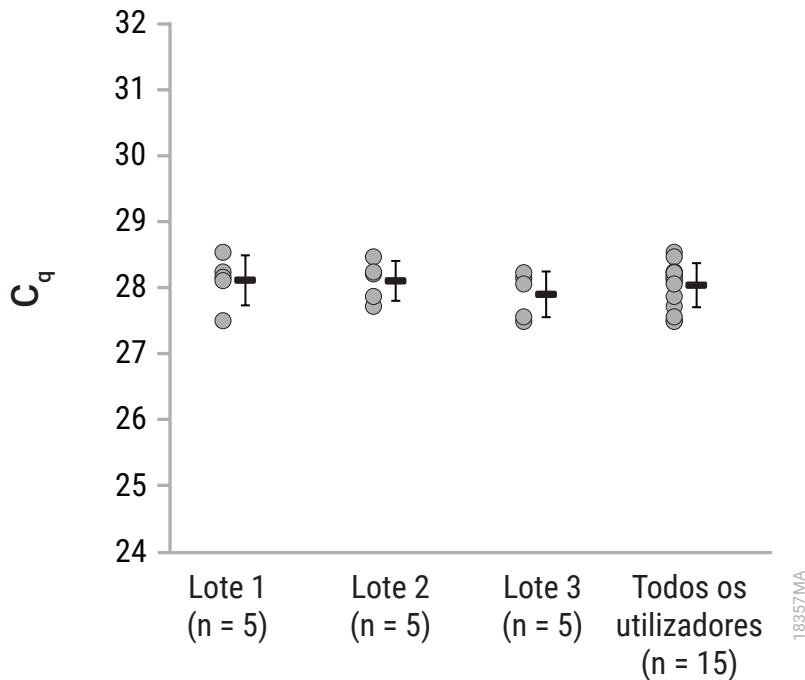


Figura 9. A reprodutibilidade da extração do ácido nucleico total em todos os três diferentes lotes do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.

9.D. Inibição da amplificação por causa de substâncias interferentes

Para avaliar a fim de detetar qualquer inibição na amplificação devido a substâncias interferentes a co-purificar com o ácido nucleico, o ácido nucleico total foi purificado a partir de oito replicados de 300 µl de uma suspensão de fezes fortificada com 3×10^4 células de *Clostridium difficile* inativado. Foram utilizados cinco microlitros de cada eluato de ácido nucleico total sem diluição e 5 µl de uma diluição de dez vezes num ensaio de qPCR para amplificar um alvo de DNA específico para *C. difficile* para avaliar o efeito das substâncias interferentes. No caso do Maxwell® CSC Instrument, todos os valores de C_q dos eluatos sem diluição eram de $\leq 27,57$ ciclos, com um C_q médio de 26,93 ciclos. No caso do Maxwell® CSC 48 Instrument, todos os valores de C_q dos eluatos sem diluição eram de $\leq 27,24$ ciclos, com um C_q médio de 27,03 ciclos. Os valores de C_q de eluatos sem diluição e eluatos diluídos dez vezes foram comparados para avaliar a inibição nos eluatos individuais com um ΔC_q esperado de $>2,5$ ciclos, indicando sem inibição. O ΔC_q dos eluatos sem diluição e dos eluatos diluídos dez vezes para amostras individuais variaram entre 3,24 a 3,59, indicando que quaisquer substâncias interferentes presentes no eluato causam inibição mínima.

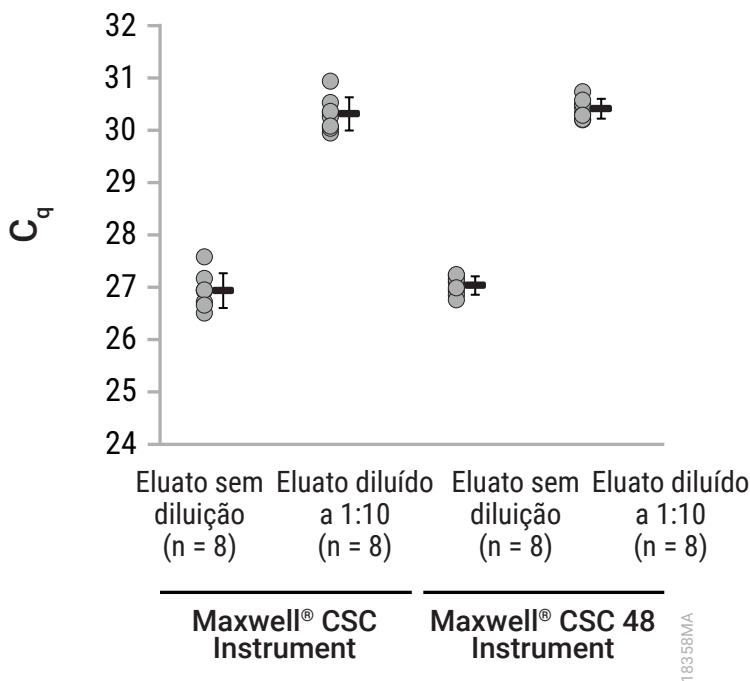


Figura 10. A avaliação da inibição da amplificação do ácido nucleico total extraído utilizando o Maxwell® CSC ou o Maxwell® CSC 48 Instrument.

9.D. Inibição da amplificação por causa de substâncias interferentes (continuação)

O ácido nucleico total foi extraído de oito replicados de 300 µl de amostras de expectoração ou BAL fortificadas com 9×10^4 cópias de *Chlamydia pneumoniae* inativada e eluída em 100 µl de tampão de eluição. Foram utilizados cinco microlitros de cada eluato de ácido nucleico total sem diluição e 5 µl de uma diluição de dez vezes num ensaio de qPCR para amplificar um alvo de DNA específico para *C. pneumoniae* para avaliar o efeito das substâncias interferentes. Todos os valores de C_q dos eluatos de ácido nucleico total sem diluição de expectoração eram de $\leq 26,59$ ciclos, com um C_q médio de 26,48 ciclos. O valor do C_q médio de uma diluição 1:10 dos eluatos do ácido nucleico total de expectoração era de 29,83 ciclos, com uma diferença entre os valores do C_q médio para amostras diluídas e sem diluição de 3,35 ciclos. Todos os valores de C_q dos eluatos sem diluição de BAL eram de $\leq 26,64$ ciclos, com um C_q médio de 26,41 ciclos. O valor do C_q médio de uma diluição 1:10 dos eluatos do ácido nucleico total de BAL era de 29,83 ciclos, com uma diferença de 3,42 ciclos entre os valores do C_q médio para amostras diluídas e sem diluição, indicando que quaisquer substâncias interferentes presentes no eluato causam inibição mínima.

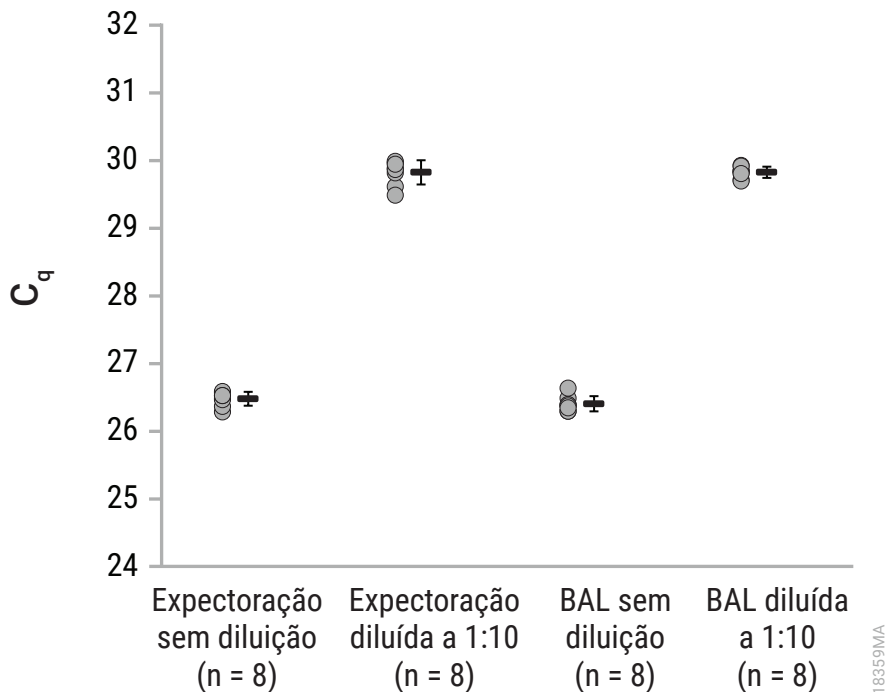


Figura 11. Avaliação da inibição da amplificação do ácido nucleico total extraído de amostras de expectoração e BAL.

A inibição da amplificação foi avaliada extraíndo o ácido nucleico total de amostras de UTM fortificadas com *B. pertussis* inativado e amplificando o ácido nucleico total resultante por qPCR. Brevemente, o ácido nucleico total foi extraído de oito replicados de 300 µl de UTM fortificado com aproximadamente 1×10^4 cópias de *B. pertussis* inativada e eluída em 100 µl de tampão de eluição. Foram utilizados cinco microlitros de cada eluato de ácido nucleico total sem diluição e 5 µl de uma diluição de dez vezes num ensaio de qPCR para amplificar um alvo de DNA específico para *B. pertussis* para avaliar o efeito das substâncias interferentes. O C_q médio dos eluatos sem diluição obtidos através de amostras de UTM era de 25,97 ciclos. O C_q médio de uma diluição 1:10 dos eluatos era de 29.49 ciclos, com uma diferença de 3,52 ciclos entre os valores de C_q médios de amostras diluídas e sem diluição, indicando que quaisquer substâncias interferentes presentes no eluato causam inibição mínima.

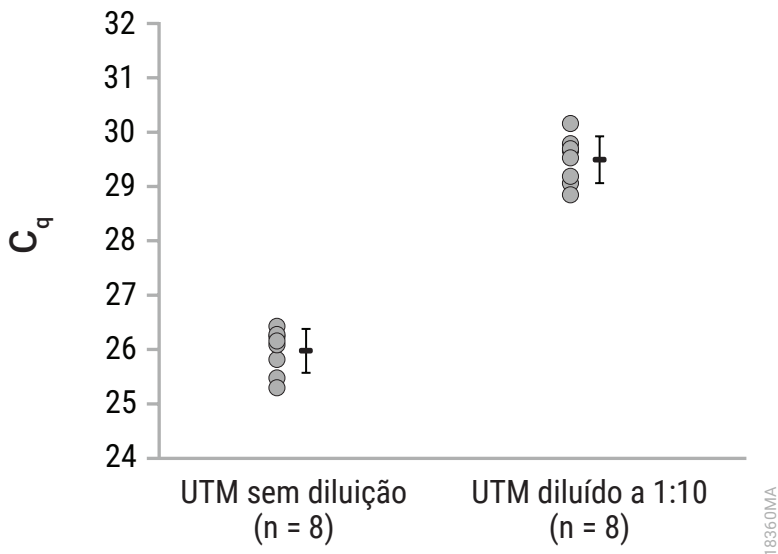


Figura 12. Avaliação da inibição da amplificação do ácido nucleico total extraído de amostras de UTM fortificadas com *B. pertussis*.

9.D. Inibição da amplificação por causa de substâncias interferentes (continuação)

A inibição da amplificação foi avaliada extraíndo o ácido nucleico total de amostras de UTM fortificadas com vírus Herpes simplex 1 inativado (HSV-1). Brevemente, o ácido nucleico total foi extraído de oito replicados de 300 µl de UTM fortificado com aproximadamente 1×10^5 cópias de HSV-1 inativado e eluído em 100 µl de tampão de eluição. Foram utilizados cinco microlitros de cada eluato de ácido nucleico total sem diluição e 5 µl de uma diluição de dez vezes num ensaio de qPCR para amplificar um alvo de DNA específico para HSV-1 para avaliar o efeito das substâncias interferentes. Todos os valores de C_q dos eluatos sem diluição eram de $\leq 27,25$ ciclos, com um C_q médio de 26,88 ciclos. O ΔC_q dos eluatos sem diluição e dos eluatos diluídos dez vezes para amostras individuais variaram entre 3,44 a 3,91, indicando que quaisquer substâncias interferentes presentes no eluato causam inibição mínima.

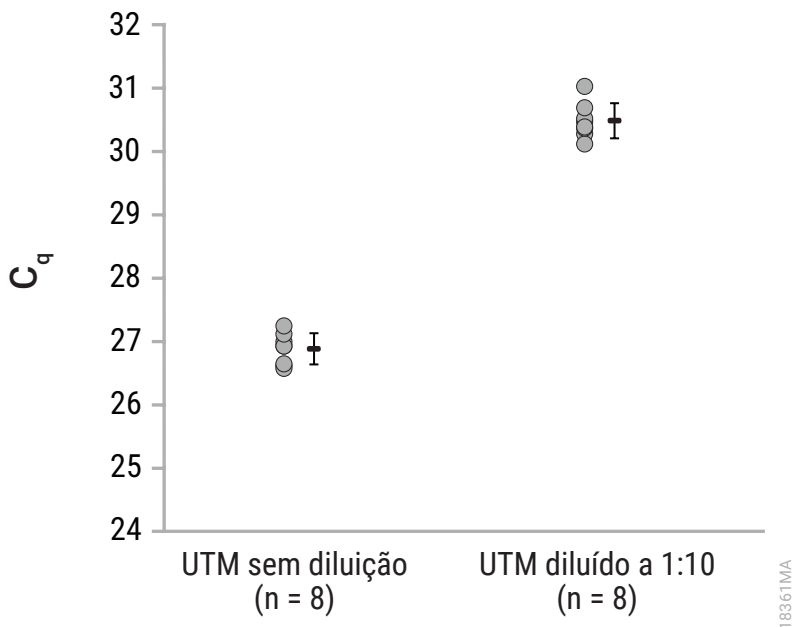


Figura 13. Avaliação da inibição da amplificação do ácido nucleico total extraído de amostras de UTM fortificadas com HSV-1.

9.E. Contaminação cruzada

A contaminação cruzada foi avaliada utilizando o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit com o Maxwell® CSC Instrument alternando os Maxwell® CSC Cartridges contendo amostras de UTM fortificadas com *B. pertussis* inativada e amostras de UTM negativas sem *B. pertussis* adicionado ao Tabuleiro de plataforma Maxwell® numa única execução de extração de ácido nucleico total. Foram utilizados eluatos de amostras de UTM de *B. pertussis* positivas e negativas num ensaio de qPCR para amplificar um alvo de DNA específico para *B. pertussis*, e os valores de C_q resultantes foram comparados com uma curva padrão (10^1 – 10^6 cópias) gerada utilizando diluições de série de DNA sintético na sequência alvo de *B. pertussis*. Todos os eluatos de UTM com *B. pertussis* adicionado tinham valores de C_q na curva padrão, com um C_q médio de 25,42 ciclos. Todos os eluatos de UTM negativos sem *B. pertussis* adicionada tinham valores de C_q superiores ao C_q obtido para a concentração de DNA mais baixa da curva padrão (10 cópias).

10. Avaliação do desempenho clínico

A avaliação do desempenho clínico do Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit foi realizada por um laboratório clínico externo utilizando o Maxwell® CSC 48 Instrument para extrair o ácido nucleico patogénico dos tipos de amostras clínicas especificados abaixo, e amplificando o ácido nucleico num ensaio clinicamente relevante.

Tabela 2. *Clostridium difficile* Extração de ácido nucleico total de amostras de fezes. O ácido nucleico total foi extraído por um dispositivo de teste de 200 mg cada de dez amostras de fezes humanas *Clostridium difficile* (*C. difficile*) positivas e dez amostras de fezes humanas *C. difficile* negativas utilizando o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. O ácido nucleico também foi purificado a partir destas amostras utilizando o método de purificação padrão do laboratório para fins de referência. Os eluatos resultantes foram analisados amplificando os alvos de DNA da Toxina A e da Toxina b de *C. difficile* num ensaio de qPCR. O ácido nucleico extraído de todas as amostras *C. difficile* negativas e *C. difficile* positivas presumidas purificadas com o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit originou o resultado esperado e demonstrou concordância com os resultados obtidos do ácido nucleico extraído utilizando o método de extração de referência do laboratório.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Método de referência do laboratório
Amostras correspondendo ao estado <i>C. difficile</i> negativo	10/10	10/10
Amostras correspondendo ao estado <i>C. difficile</i> positivo	10/10	10/10

10. Avaliação do desempenho clínico (continuação)

Tabela 3. Extração do ácido nucleico total do citomegalovírus de amostras de lavagem broncoalveolar (BAL). O ácido nucleico total foi extraído por um dispositivo de teste através de dez amostras de BAL humano de citomegalovírus (CMV) positivas (100 µl e 300 µl) e dez amostras de BAL humano de CMV negativas (300 µl) utilizando o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Além disso, o ácido nucleico total foi extraído de 300 µl das mesmas dez amostras de BAL CMV positivas e dez amostras de BAL CMV negativas utilizando o método de purificação padrão do laboratório para referência. Os eluatos resultantes foram analisados amplificando o alvo de DNA de gene precoce imediato importante de CMV num ensaio de qPCR. O ácido nucleico extraído de todas as amostras CMV negativas e CMV positivas presumidas (tanto 100 µl como 300 µl) purificadas com o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit originou o resultado esperado e demonstrou concordância com os resultados obtidos do ácido nucleico extraído utilizando o método de extração de referência do laboratório.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Método de referência do laboratório
Amostras correspondendo ao estado CMV negativo	10/10 para 300 µl de volume de introdução	10/10 para 300 µl de volume de introdução
Amostras correspondendo ao estado CMV positivo	10/10 para 100 µl de volume de introdução 10/10 para 300 µl de volume de introdução	10/10 para 300 µl de volume de introdução

Tabela 4. Extração do ácido nucleico total de SARS-CoV-2 de amostras de meio de transporte viral (VTM).

Dois dispositivos de teste extraíram o ácido nucleico total de 300 µl de VTM que continha uma amostra de zaragatoa nasofaríngea. O ácido nucleico total foi extraído de dez amostras de VTM humano SARS CoV-2 positivas e dez amostras de VTM SARS CoV-2 negativas por dois dispositivos de teste utilizando o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Um dispositivo de teste extraíu também o ácido nucleico a partir destas amostras utilizando o método de purificação padrão do laboratório para fins de referência. Os eluatos resultantes foram analisados amplificando os genes RdRP e N do SARS CoV-2 num ensaio de qPCR. O ácido nucleico extraído de todas as amostras SARS CoV-2 negativas e SARS CoV-2 positivas presumidas purificadas por ambos os dispositivos de teste com o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit originou o resultado esperado e demonstrou concordância com os resultados obtidos do ácido nucleico extraído utilizando o método de extração de referência do laboratório.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Método de referência do laboratório
Amostras correspondendo ao estado SARS-CoV-2 negativo	10/10 para Dispositivo de teste A 10/10 para Dispositivo de teste B	10/10
Amostras correspondendo ao estado SARS-CoV-2 positivo	10/10 para Dispositivo de teste A 10/10 para Dispositivo de teste B	10/10

Tabela 5. Extração do ácido nucleico total do papilomavírus humano de amostras de meio Pap. Um dispositivo de teste extraiu o ácido nucleico total de 300 µl de amostras de meio ThinPrep® PAP que continham escovagem cervical colhida junto de pacientes humanas. O ácido nucleico total foi extraído de nove amostras de meio Pap papilomavírus humano (HPV) positivas e nove amostras de meio Pap HPV negativas com o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. O ácido nucleico também foi extraído a partir das mesmas amostras utilizando o método de purificação padrão do laboratório para fins de referência. Os eluatos resultantes foram analisados amplificando os alvos de DNA de HPV-16, HPV-18 e HPV de alto risco num ensaio de qPCR. O ácido nucleico extraído de todas as amostras do meio Pap HPV positivas extraídas com o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit originou o resultado esperado e demonstrou concordância com os resultados obtidos do ácido nucleico extraído utilizando o método de extração de referência do laboratório.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Método de referência do laboratório
Amostras correspondendo ao estado HPV negativo	9/9	9/9
Amostras correspondendo ao estado HPV positivo	9/9	9/9

Tabela 6. Extração do ácido nucleico total do citomegalovírus de amostras de urina. O ácido nucleico total foi extraído por um dispositivo de teste de 300 µl cada de dez amostras de urina humana CMV positivas e dez amostras de urina humana CMV negativas utilizando o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. O ácido nucleico também foi extraído a partir das mesmas amostras utilizando o método de purificação padrão do laboratório para fins de referência. Os eluatos resultantes foram analisados amplificando o alvo de DNA de gene precoce imediato importante de CMV num ensaio de qPCR. Todas as amostras de urina humana CMV negativas e nove das dez amostras de urina humana CMV positiva demonstraram concordância com os resultados obtidos utilizando ácido nucleico extraído pelo método de extração de referência do laboratório. Uma amostra de urina CMV presumida positiva foi discordante entre os dois métodos de purificação com um resultado negativo do Maxwell® CSC Purification System e um resultado positivo fraco (C_q mais baixo de 36,26 para quatro replicados com um resultado positivo de um total de cinco replicados testados) utilizando o método de referência do laboratório.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Método de referência do laboratório
Amostras correspondendo ao estado CMV negativo	10/10	10/10
Amostras correspondendo ao estado CMV positivo	9/10	10/10

10. Avaliação do desempenho clínico (continuação)

Tabela 7. Extração do ácido nucleico total do citomegalovírus de amostras de plasma. O ácido nucleico total foi extraído por um dispositivo de teste de 300 µl cada de dez amostras de plasma humano CMV positivas e dez amostras de plasma humano CMV negativas utilizando o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. O ácido nucleico também foi extraído a partir das mesmas amostras utilizando o método de purificação padrão do laboratório para fins de referência. Os eluatos resultantes foram analisados pela amplificação do alvo de DNA de gene precoce imediato importante de CMV num ensaio de qPCR. O ácido nucleico extraído de todas as amostras de plasma humano CMV negativas e CMV positivas presumidas purificadas com o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit originou o resultado esperado e demonstrou concordância com o resultado obtido do ácido nucleico extraído utilizando o método de extração de referência do laboratório.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Método de referência do laboratório
Amostras correspondendo ao estado CMV negativo	10/10	10/10
Amostras correspondendo ao estado CMV positivo	10/10	10/10

A contaminação cruzada ocorrendo no ambiente do utilizador previsto utilizando o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit foi avaliada alternando os Maxwell® CSC Cartridges contendo amostras de plasma humano CMV positivas e CMV negativas no tabuleiro da plataforma do Maxwell® CSC 48 Instrument numa única execução de extração do ácido nucleico total. Não foi observada qualquer contaminação cruzada visto que as amostras negativas produziram um resultado negativo num ensaio de qPCR para um alvo de DNA de CMV.

11. Criar um ambiente livre de ribonucleases

As ribonucleases são extremamente difíceis de tornar inativas. Tenha cuidado para evitar introduzir atividade de RNase nas amostras de ácido nucleico total que contêm RNA durante a após o isolamento. Esta observação é extremamente importante caso o material de base tenha sido difícil de obter ou seja insubstituível. As notas seguintes podem ajudar a evitar uma contaminação de RNase acidental das suas amostras.

1. Duas das mais importantes fontes de contaminação de RNase são as mãos do utilizador e as bactérias ou fungos que possam estar presentes nas partículas de pó suspensas no ar. Para evitar a contaminação a partir destas fontes, utilize uma técnica estéril durante o manuseamento dos reagentes fornecidos com este sistema. Use sempre luvas. Troque de luvas sempre que possa ter entrado em contacto com as ribonucleases.
2. Sempre que possível, deve ser utilizado material plástico descartável e esterilizado para manusear ácido nucleico total que contenha RNA. Estes materiais são geralmente livres de RNases e não necessitam de pré-tratamento para tornar a RNase inativa.
3. Trate as câmaras de eletroforese, o material plástico e o material em vidro não esterilizado antes da respetiva utilização para se certificar de que estão livres de RNases. Deixe o material em vidro na estufa a 200 °C de um dia para o outro e lave muito bem o material plástico com 0,1 N NaOH, 1 mM EDTA, seguido de água livre de RNases. Também podem ser utilizados produtos para a remoção de RNases disponíveis no mercado, seguindo as instruções do fabricante.

Nota: as câmaras de eletroforese podem ser contaminadas com ribonucleases, particularmente com RNase A, de análises de amostras de DNA. Sempre que possível, reserve um aparelho novo ou descontaminado apenas para a análise de RNA.

4. Trate as soluções que não são fornecidas com o sistema, adicionando dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1% v/v numa hotte. Incube de um dia para o outro com agitação à temperatura ambiente na hotte. Coloque na autoclave durante 30 minutos para remover qualquer vestígio de DEPC.



Atenção: o DEPC é suspeito de ser cancerígeno e deve ser utilizado apenas numa hotte química. O DEPC reage rapidamente com aminas e não pode ser utilizado para tratar tampões de Tris.

Nota: para todas as aplicações a jusante, é essencial que continue a proteger as suas amostras de RNA de RNases. Use luvas limpas e soluções livres de RNases e centrifugue os tubos.

12. Referências

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

13. Resolução de problemas

Contacte a filial ou o distribuidor local da Promega para obter respostas para questões não abordadas neste manual. As informações de contacto estão disponíveis em: www.promega.com. E-mail: techserv@promega.com

Sintomas

Menor recuperação de ácido nucleico patogénico que o esperado
(por exemplo, para controlos internos fornecidos pelo cliente)

Causas e observações

As amostras iniciais foram comprometidas. Certifique-se de que as amostras foram recolhidas, enviadas e armazenadas de acordo com as diretrizes recomendadas.

Para amostras de RNA viral, certifique-se de que são utilizadas condições isentas de RNase na preparação das amostras e na configuração do ensaio, incluindo tubos e pontas de pipeta isentas de RNase.

O passo de processamento foi inferior a óptimo.

- Utilize apenas o tampão de lise fornecido com o kit.
- A mistura incompleta pode reduzir a lise. Misture por rotação a amostra com a solução de lise, conforme recomendado.
- Tratamento de protease incompleto para remover cápsides virais e/ou proteínas de bactérias e parasitas. Verifique a temperatura da placa térmica ou banho de água e incube durante o tempo recomendado.
- Ao trabalhar com patogéneos de lise difícil (bactérias Gram-positivas ou parasitas) nas fezes, pode ser utilizado o passo opcional de agitação de esferas.
- Certifique-se de que foi adicionado 1-tioglicerol para o pré-processamento de amostras de BAL ou expectoração. A omissão do 1-tioglicerol pode afetar as colheitas.
- A adição de uma quantidade de amostra superior ao recomendado pode reduzir a recuperação do ácido nucleico.

Verifique se foi adicionado um êmbolo ao cartucho.

Problemas relacionados com armazenamento pós-purificação.

- Retire os eluatos e guarde à temperatura recomendada imediatamente após a execução do Maxwell® Instrument.
- Não sujeite os eluatos a múltiplos ciclos de congelação-descongelação antes de ensaios a jusante.

Os controlos de ácido nucleico inferiores a 100 bp poderão não ser purificados de forma eficaz utilizando o sistema. O utilizador é responsável por estabelecer o desempenho de qualquer controlo interno.

Sintomas	Causas e observações
Fraca amplificação	O transporte de partículas paramagnéticas pode causar interferência nas reações de amplificação. Remova as partículas no tubo de eluição por centrifugação ou separação magnética. Foi adicionado o tampão de eluição errado. Utilize apenas o tampão de eluição fornecido com o Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.
Contaminação cruzada	Utilize pontas de pipeta novas para cada amostra para evitar contaminação entre as amostras. Evite salpicar quando adicionar lisatos aos cartuchos. Os cartuchos podem ser removidos do tabuleiro da plataforma para adição das amostras, de forma a minimizar a contaminação dos cartuchos adjacentes.
O instrumento não consegue agarrar os êmbolos	Certifique-se de que está a utilizar um kit de química específico Maxwell® CSC; os êmbolos para os Kits de Reagentes Maxwell® CSC são específicos para os Maxwell® Instruments suportados para este kit.

Qualquer incidente grave que ocorra relacionado com o dispositivo que conduza, ou possa conduzir, a morte ou ferimentos graves de um utilizador ou paciente deverá ser comunicado imediatamente ao fabricante. Os utilizadores que se encontrem na União Europeia também deverão reportar incidentes graves à Autoridade Competente no país onde o utilizador e/ou o paciente se encontrem.

14. Produtos relacionados

Instrumento e acessórios

Produto	Tamanho	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument	1 de cada	AS6000
Maxwell® CSC 48 Instrument	1 de cada	AS8000
Maxwell® RSC/CSC Plungers, 50/pacote	1 de cada	AS1331
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 de cada	SP6019
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 de cada	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 de cada	AS8402
ClickFit Microtube, 1,5 ml	1000/pacote	V4741

Maxwell® CSC Reagent Kits

Para obter uma lista dos Kits de Purificação Maxwell® CSC disponíveis, visite: www.promega.com

^(a)Pat. dos EUA N.º 7.329.488 e Pat. da Coreia do Sul N.º 100483684.

© 2022 Promega Corporation. Todos os direitos reservados.

Maxwell é uma marca comercial registada da Promega Corporation.

ThinPrep é uma marca comercial registada da Hologic, Inc.

Os produtos podem estar cobertos por patentes pendentes ou por patentes emitidas ou podem ter algumas limitações. Visite o nosso Web site para obter mais informações. Todos os preços e especificações estão sujeitos a alterações sem aviso prévio.

As características dos produtos estão sujeitas a alteração. Contacte o nosso centro de assistência, Promega Technical Services, ou aceda ao catálogo da Promega online para obter as informações mais recentes acerca dos produtos da Promega.