

MANUAL TÉCNICO

Maxwell[®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Instrucciones de uso del producto
AS1860

Precaución: Manipule los cartuchos con cuidado, los bordes del sistema de sellado podrían estar afilados.



INSTRUCCIONES DE USO
DEL PRODUCTO

AS1860



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Alemania

Maxwell[®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Toda la documentación técnica está disponible en: www.promega.com/protocols/
 Visite el sitio web para verificar que está utilizando la versión más actualizada de este Manual Técnico.
 Si tiene alguna pregunta sobre el uso de este sistema, póngase en contacto con Promega Technical Services: techserv@promega.com

1. Descripción	2
2. Componentes del producto y condiciones de almacenamiento	3
3. Finalidad del producto/uso previsto	5
4. Limitaciones de uso del producto	5
5. Antes de empezar	6
6. Preparación de la muestra.....	7
6.A. Preparación de muestras de heces para su uso con el Maxwell [®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.....	7
6.B. Preparación de muestras de BAL o esputo para su uso con el Maxwell [®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.....	8
6.C. Preparación de muestras de orina para su uso con el Maxwell [®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.....	9
6.D. Preparación de muestras de plasma, medios de transporte viral o medios de Papanicolaou para su uso con el Maxwell [®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	10
6.E. Preparación del Maxwell [®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge	10
7. Configuración y ejecución del Maxwell [®] Instrument.....	12
8. Almacenamiento de ácido nucleico eluido	14
9. Evaluación del rendimiento analítico	15
9.A. Cantidad, calidad y amplificabilidad del ADN	15
9.B. Cantidad, calidad y amplificabilidad del ARN	16
9.C. Reproducibilidad.....	18
9.D. Inhibición de la amplificación debida a sustancias que interfieren	21
9.E. Contaminación cruzada.....	25
10. Evaluación del rendimiento clínico.....	25
11. Creación de un entorno sin ribonucleasa	29
12. Bibliografía.....	30
13. Solución de problemas	31
14. Productos relacionados	33

El Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit solamente está disponible en algunos países.

1. Descripción

El Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit^(a) se utiliza con los Maxwell® Instruments especificados en la tabla 1 para proporcionar un método fácil para la preparación eficiente y automatizada de muestras y la purificación de ácido nucleico total del patógeno. Los Maxwell® CSC Instruments se han diseñado para usarse con cartuchos de reactivos predispensados y procedimientos de purificación preprogramados, para una máxima sencillez y comodidad. El Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit se diseñó para hacer la extracción automatizada de ácidos nucleicos totales bacterianos, virales y de parásitos de las siguientes muestras biológicas humanas: heces, esputo, lavado broncoalveolar, orina, plasma, hisopados nasofaríngeos e hisopados cervicales en medio de transporte. El método de Maxwell® Instrument para el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit puede procesar desde una hasta el máximo número de muestras del Maxwell® Instrument en aproximadamente 40 minutos. El bajo volumen de elución de 100 µl da como resultado un ácido nucleico purificado concentrado para aplicaciones posteriores como la PCR cuantitativa (qPCR) o la RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR). Después de un breve paso de preprocesamiento de lisis, la muestra se añade al Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge. Además, el resto del proceso está totalmente automatizado.

Tabla 1. Instrumentos compatibles.

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

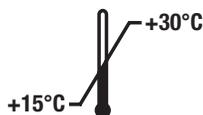
Principio del método

El Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit purifica las muestras mediante partículas paramagnéticas, que proporcionan una fase sólida móvil para optimizar la recogida de muestras, el lavado y la purificación del ácido nucleico. Los Maxwell® Instruments son instrumentos de manipulación de partículas magnéticas que unen eficazmente los ácidos nucleicos a la partícula paramagnética en el primer pocillo de un cartucho precargado. Las muestras se procesan a través de una serie de lavados antes de que se eluya el ácido nucleico total.

2. Componentes del producto y condiciones de almacenamiento

PRODUCTO	TAMAÑO	CAT.#
Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	48 preps	AS1860

Para uso en diagnóstico in vitro. Solo para uso profesional. Suficiente para 48 aislamientos. Los cartuchos son de un solo uso.



Incluye:

- 150 ml tampón de dilución (ST1)
- 900 µl 1-tioglicerol
- 20 ml tampón lítico
- 2 × 1 ml solución de proteinasa K (PK)
- 50 émbolos CSC/RSC
- 48 Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ)
- 50 tubos de elución (0,5 ml)
- 20 ml tampón de elución

Condiciones de almacenamiento: Al recibirlo, retire el 1-tioglicerol y almacénelo a una temperatura entre +2 °C y +10 °C. Almacene los demás componentes del kit a temperatura ambiente (+15 °C a +30 °C).



Información de seguridad: Los cartuchos contienen etanol, isopropanol y clorhidrato de guanidina. El etanol y el isopropanol deben considerarse inflamables, dañinos e irritantes. El clorhidrato de guanidina debe considerarse tóxico, dañino e irritante. Consulte la SDS para obtener la información sobre seguridad detallada.



Los cartuchos están diseñados para su uso con sustancias potencialmente infecciosas. Debe llevar la protección adecuada (por ejemplo, guantes y gafas) al manipular sustancias infecciosas. Siga las directrices institucionales de manipulación y eliminación de todas las sustancias infecciosas utilizadas en este sistema.

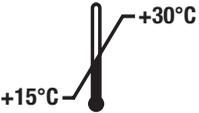


Precaución: Maneje los cartuchos con cuidado, los bordes podrían estar afilados.

Información adicional: Los componentes del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit son aptos para el uso conjunto y se han sometido a las pruebas de control de calidad pertinentes. **No** mezcle los componentes del kit entre diferentes lotes del mismo. Utilice únicamente los componentes proporcionados en el kit. No utilice los cartuchos si el sellado del cartucho no está intacto al recibirlo. Para obtener información sobre seguridad adicional, consulte la ficha técnica de seguridad disponible en: www.promega.com

2. Componentes del producto y condiciones de almacenamiento (continuación)

Leyenda de símbolos

Símbolo	Explicación	Símbolo	Explicación
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		No reutilizar
	Se debe almacenar a temperaturas entre +15 °C y +30 °C.		Fabricante
	Precaución		Inflamable
	Peligro para la salud		Válido para pruebas "n"
	Advertencia. Peligro de aprisionamiento.		Advertencia. Riesgos biológicos.
	Número de lote		Número de catálogo
	Conformidad europea		Representante autorizado

3. Finalidad del producto/uso previsto

El Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit está diseñado para usarse, en combinación con Maxwell® CSC Instruments y el método Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid, como un dispositivo médico de diagnóstico in vitro (IVD, por sus siglas en inglés) para hacer el aislamiento automatizado de ácidos nucleicos totales virales, bacterianos y de parásitos de los siguientes tipos de muestras humanas: heces, esputo, lavado broncoalveolar, hisopados nasofaríngeos en medios de transporte, hisopados cervicales en medios de transporte, orina y plasma. El ácido nucleico total purificado es adecuado para el uso en análisis de diagnóstico in vitro basados en amplificación.

El Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit está diseñado para emplearse a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C. El uso fuera de este rango de temperatura puede provocar resultados no óptimos.

El Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit solamente está diseñado para uso profesional. Los resultados de diagnóstico obtenidos mediante la purificación del ácido nucleico total con este sistema deberán interpretarse junto con otros datos clínicos o de laboratorio.

4. Limitaciones de uso del producto

Se evaluó el rendimiento del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit para los siguientes patógenos mediante los tipos de muestras que se mencionan abajo:

- Bacterias: heces, esputo, lavado broncoalveolar, hisopados nasofaríngeos en medios de transporte, hisopados cervicales en medios de transporte, orina.
- Parásitos: heces, hisopados cervicales en medios de transporte, orina.
- Virus: heces, esputo, lavado broncoalveolar, hisopados nasofaríngeos en medios de transporte, hisopados cervicales en medios de transporte, orina, plasma.

El Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit no está diseñado para usarse con muestras no humanas.

Se deben incluir controles apropiados en cualquier aplicación de diagnóstico posterior que use ácido nucleico total purificado mediante Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. El usuario es responsable de validar las características de rendimiento necesarias para las aplicaciones diagnósticas posteriores.

5. Antes de empezar

Materiales que ha de aportar el usuario

- Tubos de 1,5–2,0 ml para la incubación de muestras (por ejemplo, ClickFit Microtube, 1,5 ml [Cat.# V4741]; se recomienda para evitar que la tapa se abra durante el calentamiento)
- Tubo cónico de 15 ml o 50 ml para la preparación de la solución lítica
- Vórtex de mesa
- Pipeteadores y puntas de pipeta para transferir muestras a cartuchos de reactivos precargados
- Bloque calefactado o baño de agua a 56 °C
- Bloque calefactado ajustado a 95 °C para muestras de esputo y BAL
- **opcional:** 1X PBS para diluir BAL y muestras de esputo
- **opcional:** centrífuga para preprocesamiento de muestras de orina
- **opcional:** perlas de zirconio de 0,1 a 0,5 mm para el preprocesamiento de muestras de heces (p. ej., perlas de impacto ZR, Zymo [n.º de cat. S6012-50])
- Tubos para muestras de heces, esputo, lavado broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés), medio de transporte viral (VTM, por sus siglas en inglés), medio de Papanicolaou, plasma y orina



Se recomienda tomar precauciones frente a los patógenos de transmisión hemática cuando se manipulen muestras humanas.

Para las muestras de plasma, recoja la sangre en tubos anticoagulantes de EDTA. Evite el uso de tubos de extracción de sangre que contengan heparina porque la heparina puede inhibir las amplificaciones posteriores.

Las recomendaciones generales proporcionadas a continuación se refieren a la preparación y el almacenamiento de muestras (de las referencias 1 a 4):

1. Separe el plasma de las células en la hora posterior a la extracción de sangre mediante un centrifugado a 1500 × g durante 20 minutos a 25 °C. A continuación, transfiera la capa de plasma a un tubo limpio. Almacene el plasma a 2–8 °C durante un máximo de 24 horas o congele las muestras no procesadas en las 24 horas posteriores a –20 °C durante un máximo de 5 días.
2. Para los hisopos en VTM, utilice únicamente hisopos de fibra sintética con vástagos de plástico. No utilice hisopos de alginato de calcio ni hisopos con vástagos de madera, ya que pueden contener sustancias que inhiban las pruebas de PCR. Coloque los hisopos inmediatamente en tubos estériles que contengan 2–3 ml de medio de transporte viral. Almacene el VTM y las muestras a 2–8 °C durante un máximo de 72 horas o congele las muestras a –70 °C. Evite los ciclos repetidos de congelación y descongelación, y no almacene las muestras en un congelador que no genere escarcha. Las condiciones específicas de recogida y almacenamiento pueden variar en función de los virus aislados.
3. Almacene las muestras de orina frescas a 4 °C durante un máximo de 24 horas antes de procesarlas. Para un almacenamiento a más largo plazo, agregue EDTA a una concentración final de 20 mM. Para evitar la lisis celular, almacene la orina estabilizada a 4 °C. Para evitar la lisis celular, la orina no debe congelarse. Si la orina se congela y descongela, se podría ver un precipitado. La mezcla y/o el calentamiento de la muestra deberían volver a solubilizar el precipitado. Evite centrifugar la muestra para eliminar el precipitado porque esto puede eliminar las células patógenas intactas.

- Almacene las muestras de BAL y de esputo a 2–8 °C durante un máximo de 72 horas o congele las muestras a –70 °C. Evite los ciclos repetidos de congelación y descongelación, y no almacene las muestras en un congelador que no genere escarcha. Las condiciones específicas de recogida y almacenamiento pueden variar en función del patógeno aislado.
- Las muestras de heces deben congelarse entre –20 °C y –80 °C antes de procesarlas.

6. Preparación de la muestra

6.A. Preparación de muestras de heces para su uso con el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

- Pese de 100–500 mg de muestra fecal en un tubo de microcentrifuga de 2 ml con tapa a rosca.
- Agregue 1 ml de Tampón de dilución (ST1) para volver a suspender la muestra. Mezcle vigorosamente durante 30 segundos a 1 minuto. Utilice puntas de pipeta nuevas para cada muestra para evitar la contaminación entre muestras.
- Centrifugue la muestra 1000 × g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Transfiera el sobrenadante a un tubo de tamaño adecuado y mida el volumen.
- Agregue 2 veces el volumen del Tampón de dilución (ST1) para una dilución 1:2 de la muestra de heces [p. ej., 1 ml de sobrenadante de heces + 2 ml del Tampón de dilución (ST1)]. Utilice esta dilución de muestra de heces para purificaciones de ADN.

Nota: para extraer el ARN viral, diluya más la muestra de heces 1:8 en agua sin nucleasas (p. ej., 100 µl de dilución 1:2 de muestra de heces + 700 µl de agua sin nucleasas). Guarde la muestra a temperatura ambiente hasta que esté lista para su procesamiento.

Método opcional de batido de perlas para extraer ADN de patógenos difíciles de lisar en muestras de heces

Nota: para extraer ácidos nucleicos de patógenos difíciles de lisar, como bacterias Gram-positivas o protozoos en muestras de heces, se puede realizar un paso opcional de batido de perlas. Esta homogeneización adicional puede aumentar el rendimiento de purificación de ácidos nucleicos si el método de lisis estándar es insuficiente.

- Transfiera 600 µl a 1 ml de muestra de heces diluida a un tubo de 2 ml que contenga perlas y cierre el tubo.
 - Coloque los tubos en un agitador vorticial de placas o equivalente y mezcle en vórtex o perlé a velocidad máxima durante 10 minutos.
 - Centrifugue los tubos en una microcentrifuga durante 1 minuto a máxima velocidad para separar las perlas de la muestra.
- Agregue 300 µl de lisado de heces a un tubo nuevo de 1,5 ml.
 - Agregue 300 µl de tampón lítico y mezcle en vórtex durante 10 segundos.
 - Agregue 30 µl de solución de proteinasa K y agite brevemente para mezclar.
 - Incube a 56 °C durante 20 minutos.
 - Continúe con la preparación del cartucho Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid (sección 6.E).



6.B. Preparación de muestras de BAL o esputo para su uso con el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

1. Si está congelado, descongele el BAL o la muestra de esputo a temperatura ambiente.
Nota: para reducir la viscosidad de las muestras de BAL y esputo, diluya en un volumen igual de 1X PBS, homogeneice mecánicamente o diluya y homogeneice antes del procesamiento.
2. Para cada muestra, agregue 100–300 μ l a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. (Recomendamos usar una pipeta de calibre ancho). Utilice puntas de pipeta nuevas para cada muestra para evitar la contaminación entre muestras.
3. Agregue 12 μ l de 1-tioglicerol y pipetee para mezclar.
Nota: pipetee lentamente porque la solución es viscosa.
4. Agregue 300 μ l de tampón lítico y mezcle en vórtex durante 10 segundos.
5. Incube a 95 °C durante 5 minutos. Enfríe en la mesa de trabajo durante 2 minutos.
6. Agregue 30 μ l de solución de proteinasa K y agite brevemente para mezclar.
7. Incube a 56 °C durante 20 minutos.
8. Continúe con la preparación del cartucho Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid (sección 6.E).

6.C. Preparación de muestras de orina para su uso con el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Preparación de pequeños volúmenes de muestra (300 µl de orina):

1. Mezcle en vórtex brevemente la muestra de orina para volver a suspender las células sedimentadas.
2. Para cada muestra, agregue 300 µl de orina a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Utilice puntas de pipeta nuevas para cada muestra para evitar la contaminación entre muestras.
3. Agregue 300 µl de tampón lítico y mezcle en vórtex durante 10 segundos.
4. Agregue 30 µl de solución de proteinasa K y agite brevemente para mezclar.
5. Incube a 56 °C durante 20 minutos.
6. Continúe con la preparación del cartucho Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid (sección 6.E).

Preparación de grandes volúmenes de muestra (30 ml de orina):

1. Mezcle en vórtex brevemente la muestra de orina para volver a suspender las células sedimentadas.
2. Para cada muestra, agregue 30 ml de orina a un tubo de 50 ml. Utilice puntas de pipeta nuevas para cada muestra para evitar la contaminación entre muestras.
3. Centrifugue la muestra de orina a 2000 × *g* durante 10 minutos.
4. Retire el sobrenadante con una pipeta, teniendo cuidado de no alterar el sedimento.
Nota: se puede dejar algo de líquido para preservar la integridad del sedimento (hasta 300 µl).
5. Agregue 300 µl del tampón lítico al tubo y vuelva a suspender el sedimento pipeteando.
6. Transfiera el lisado a un tubo de 1,5 ml.
7. Agregue 30 µl de solución de proteinasa K y agite brevemente para mezclar.
8. Incube a 56 °C durante 20 minutos.
9. Continúe con la preparación del cartucho Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid (sección 6.E).

6.D. Preparación de muestras de plasma, medios de transporte viral o medios de Papanicolaou para su uso con el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

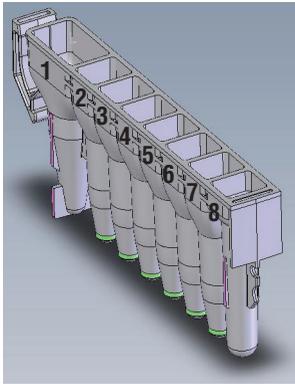
1. Si está congelado, descongele el plasma o los medios a temperatura ambiente y agítelos con vórtex brevemente para mezclarlos.
2. Para cada muestra, agregue 300 µl de muestra biológica que contenga plasma o medio a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Utilice puntas de pipeta nuevas para cada muestra para evitar la contaminación entre muestras.
3. Agregue 300 µl de tampón lítico y mezcle en vórtex durante 10 segundos.
4. Agregue 30 µl de solución de proteinasa K y agite brevemente para mezclar.
5. Incube a 56 °C durante 20 minutos.
6. Continúe con la preparación del cartucho Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid (sección 6.E).

6.E. Preparación del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge

1. Cámbiense los guantes antes de manipular cartuchos, émbolos y tubos de elución (0,5 ml). Coloque los cartuchos que se van a utilizar en las bandejas de plataforma con el pocillo n.º 1 (el de mayor tamaño del cartucho) en dirección contraria a los tubos de elución. Presione hacia abajo el cartucho para encajarlo en su sitio. Tire cuidadosamente del sistema de sellado para retirar por completo el plástico de la parte superior del cartucho. Asegúrese de haber eliminado toda la cinta de sellado y el adhesivo residual antes de colocar los cartuchos en el instrumento.
2. Coloque un émbolo en el pocillo n.º 8 de cada cartucho.
3. Coloque un tubo de elución vacío (0,5 ml) en la posición del tubo de elución para cada cartucho en las bandejas de plataforma.
4. Agregue 100 µl de tampón de elución en el fondo de cada tubo de elución.
5. Haga girar brevemente los lisados de muestra en una microcentrifuga para recoger el líquido en el fondo del tubo. Transfiera el lisado de la muestra al pocillo n.º 1 (el más grande) del cartucho. No agregue nada más que el lisado de muestra al cartucho.
6. Continúe en la sección 7, Configuración y ejecución del Maxwell® Instrument.

Notas:

- a. Los derrames de muestras o reactivos en cualquier parte de la bandeja de plataforma deberán limpiarse con una solución de agua y detergente y, posteriormente, con un spray o paño bactericida seguidos por agua. No utilice lejía en las piezas del instrumento.
- b. Utilice únicamente los tubos de elución de 0,5 ml proporcionados en el kit. Es posible que otros tipos de tubos sean incompatibles con el Maxwell® Instrument.



Adiciones del usuario a los pocillos

1. Muestras de lisados
8. Émbolo CSC/RSC

Figura 1. Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge. Se añade la muestra preprocesada al pocillo n.º 1 y un émbolo al pocillo n.º 8.

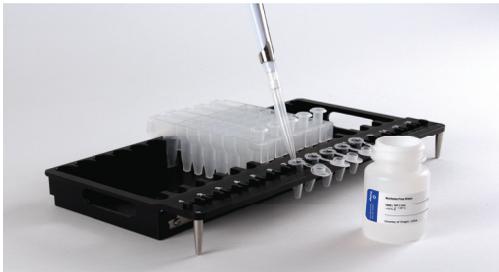


Figura 2. Preparación y configuración de las bandejas de plataforma. Se añade un Tampón de elución a los tubos de elución de la manera indicada. Los émbolos se encuentran en el pocillo n.º 8 del cartucho.

7. Configuración y ejecución del Maxwell® Instrument

Para obtener información detallada, consulte el Manual técnico específico de su Maxwell® Instrument (consulte la tabla 1).

1. Encienda el Maxwell® Instrument y el Tablet PC. Regístrese en el Tablet PC e inicie el software de Maxwell® en modo IVD tocando dos veces el icono del escritorio. El instrumento se encenderá, realizará las autocomprobaciones y colocará todas las piezas en la posición de inicio.
2. Toque **Iniciar** para comenzar el proceso de ejecución de un método.
3. Escanee o introduzca el código de barras del método que figura en la esquina superior derecha de la etiqueta del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit para seleccionar automáticamente el método que desea ejecutar (figura 3).

Nota: el código de barras del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit es obligatorio para la purificación en los Maxwell® CSC Instruments. La etiqueta del kit contiene dos códigos de barras. El código de barras del método se indica a continuación, en la figura 3. Si no puede escanearse el código de barras, póngase en contacto con Promega Technical Services.



Figura 3. Etiqueta del kit que indica el código de barras del método que debe escanearse. El código de barras que debe escanearse para iniciar una purificación se muestra en el cuadro rojo, en la esquina superior derecha de la etiqueta del kit.

4. En la pantalla “Configuración de cartucho”, toque las posiciones de cartuchos para seleccionar cualquier posición que se utilizará para esta extracción o para anular su selección. Introduzca cualquier información de seguimiento de muestras necesaria y pulse el botón **Continuar** para seguir.

Nota: al usar los Maxwell® Instruments de 48 posiciones, pulse los botones **Parte frontal** o **Parte trasera** para seleccionar las posiciones del cartucho en cada bandeja de plataforma o anular su selección.

- Una vez abierta la puerta, confirme que se hayan realizado todos los elementos de la lista de comprobación de extracción. Verifique que las muestras se hayan añadido al pocillo n.º 1 de los cartuchos, que los cartuchos estén cargados en el instrumento, que los tubos de elución sin tapar estén presentes con el tampón de elución y que los émbolos estén en el pocillo n.º 8. Transfiera las bandejas de plataforma que contengan los cartuchos preparados a la plataforma del Maxwell® Instrument.

Introducción de la bandeja de plataforma Maxwell®: sostenga la bandeja de plataforma por los laterales para evitar que los cartuchos se salgan de esta. Asegúrese de que la bandeja de plataforma se coloque en el Maxwell® Instrument con los tubos de elución próximos a la puerta. Dirija la parte posterior de la bandeja de plataforma hacia abajo y colóquela en el instrumento, de modo que esta toque la parte posterior de la plataforma del instrumento. Presione hacia abajo en la parte frontal de la bandeja de plataforma para asentar firmemente la bandeja de plataforma en la plataforma del instrumento. Si tiene dificultades para encajar la bandeja en la plataforma, compruebe que esta se encuentre en la orientación correcta. Asegúrese de que la bandeja de plataforma esté nivelada en la plataforma del instrumento y completamente asentada.

Nota: compruebe el identificador de las bandejas de plataforma Maxwell® de 24 posiciones para determinar si deben colocarse en la parte frontal o trasera del instrumento.

- Confirme que se ha realizado todo el preprocesamiento indicado y pulse **Iniciar** para cerrar la puerta del instrumento e iniciar el procesamiento.

Nota: al usar un Maxwell® Instrument de 48 posiciones, si se ha activado el sistema de visión, las bandejas de plataforma se escanearán mientras se retrae la puerta. Cualquier error en la configuración de las bandejas de plataforma (por ejemplo, los émbolos no están en el pocillo n.º 8 o los tubos de elución no están presentes y abiertos) provocará que el software vuelva a la pantalla "Configuración de cartucho" y las posiciones con problemas se marcarán con un signo de exclamación en un círculo rojo. Toque el signo de exclamación para ver una descripción del error y resolver todos los estados de error. Vuelva a tocar el botón **Iniciar** para repetir el escaneo de las bandejas de plataforma y comenzar la ejecución de extracción.



Advertencia: peligro de aprisionamiento.

El Maxwell® Instrument iniciará de forma inmediata la purificación. La pantalla mostrará información que incluye el usuario que inició la ejecución, el paso actual del método que se está realizando y el tiempo aproximado que queda en la ejecución.

Notas:

- Al tocar el botón **Cancelar**, se abandonará la ejecución. Se perderán todas las muestras de una ejecución cancelada.
- Si se cancela la ejecución antes de que finalice, puede que se le pida que compruebe si sigue habiendo émbolos cargados en la barra de émbolo. Si hay émbolos presentes en la barra de émbolo, debe ejecutar **Limpiar** cuando se le pida. Si no hay émbolos presentes en la barra de émbolo, puede elegir no hacer la **limpieza**. Se perderán las muestras. No intente volver a purificar las muestras si se ha cancelado la ejecución de un instrumento.



7. Configuración y ejecución del Maxwell® Instrument (continuación)

7. Para abrir la puerta, siga las instrucciones en pantalla que aparecen al final del método. Verifique que los émbolos se encuentren en el pocillo n.º 8 del cartucho al final de la ejecución. Si no se han retirado los émbolos de la barra de émbolo, siga las instrucciones del Manual técnico correspondiente a su Maxwell® Instrument (tabla 1) para ejecutar el proceso **Limpiar** para intentar descargar los émbolos.
8. Retire las bandejas de plataforma del instrumento. Retire los tubos de elución que contengan ácido nucleico total del patógeno y tápelos. Si hay partículas paramagnéticas en los tubos de elución, centrifugue a 10 000–20 000 × g de 30 segundos a 1 minuto, luego transfiera el sobrenadante a tubos de almacenamiento (no incluidos). Una vez finalizada la ejecución, se mostrará el informe de la ejecución de extracción. En la pantalla “Vista de informe”, puede imprimir o exportar este informe o ambos.
9. Retire los cartuchos y los émbolos de las bandejas de plataforma y deséchelos como residuos peligrosos siguiendo los procedimientos institucionales recomendados. No reutilice los cartuchos de reactivos, los émbolos ni los tubos de elución.

Nota: asegúrese de que las muestras se eliminen antes de realizar cualquier tratamiento de luz ultravioleta requerido del instrumento para evitar daños en el ácido nucleico.

8. Almacenamiento de ácido nucleico eluido

Si las muestras no se procesan de forma inmediata, almacene el ADN del patógeno eluido en hielo o a 4 °C durante un máximo de 24 horas. Para un almacenamiento más prolongado, congélelo a –20 °C o –70 °C. El ARN es menos estable y es preferible que se pruebe en análisis posteriores inmediatamente después del aislamiento. Si hace la prueba poco después del aislamiento, almacene el ARN del patógeno en hielo o a 4 °C. Como alternativa, almacene el ARN patógeno eluido a –70 °C. Consulte las instrucciones de las aplicaciones posteriores para conocer las recomendaciones específicas de manipulación y almacenamiento de muestras.

9. Evaluación del rendimiento analítico

La evaluación del rendimiento analítico del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit se realizó utilizando varios tipos de muestras enriquecidas con patógenos inactivados procesados en Maxwell® CSC y Maxwell® CSC 48 Instruments.

9.A. Cantidad, calidad y amplificabilidad del ADN

El ácido nucleico total se extrajo de 300 µl de réplicas de una suspensión de heces, cada una de las cuales se enriqueció con aproximadamente $2,5 \times 10^4$ copias de *Giardia lamblia* inactivada utilizando el método de preprocesamiento estándar o el método de batido de perlas. El ácido nucleico total se eluyó utilizando 100 µl de tampón de elución. Se usaron cinco microlitros de cada eluato sin diluir en un ensayo de qPCR para amplificar un objetivo de ADN específico para *G. lamblia*. El C_q medio generado con el método estándar fue de 34,39 ciclos. El C_q medio generado mediante el método de batido de cuentas fue de 29,35 ciclos.

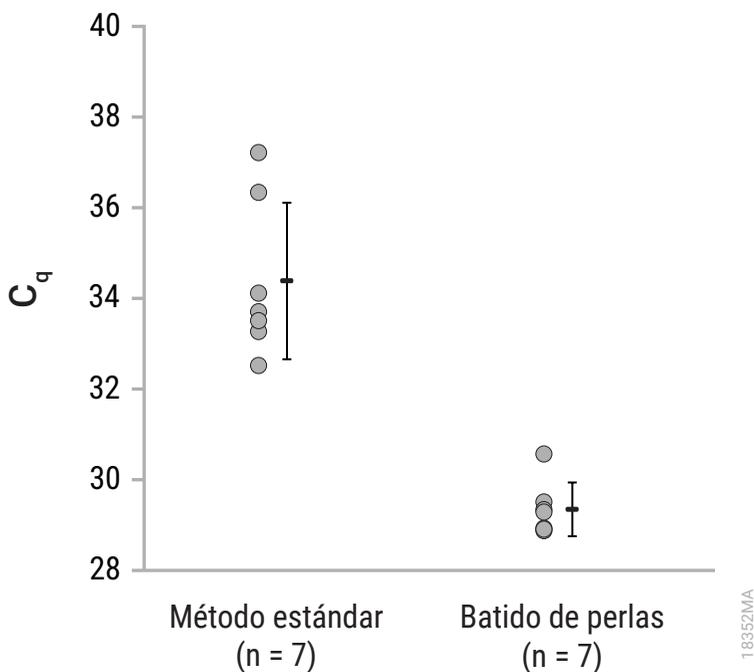


Figura 4. Amplificación de la secuencia de ADN diana de *G. lamblia* mediante el uso de ácido nucleico total extraído de muestras de heces mediante el método estándar frente al método de batido de perlas.

9.B. Cantidad, calidad y amplificabilidad del ARN

Para demostrar que el rendimiento del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit es similar cuando se usa con Maxwell® CSC o Maxwell® CSC 48 Instrument, se extrajo el ácido nucleico total utilizando el kit con ambos instrumentos de ocho réplicas de esputo de 300 µl. muestras enriquecidas con 1×10^4 copias del virus SARS CoV-2 inactivado. El ácido nucleico total se eluyó en 100 µl de tampón de elución y se usaron 5 µl de cada eluato en un ensayo de RT-qPCR para amplificar una secuencia de ARN diana específica del SARS CoV-2. La comparación de los resultados de la RT-qPCR obtenidos del ácido nucleico total extraído con Maxwell® CSC Instrument y Maxwell® CSC 48 Instrument mostró que todos los $|\Delta C_q|$ valores fueron $\leq 0,59$ ciclos, con un promedio de $|\Delta C_q|$ de 0,16 ciclos.

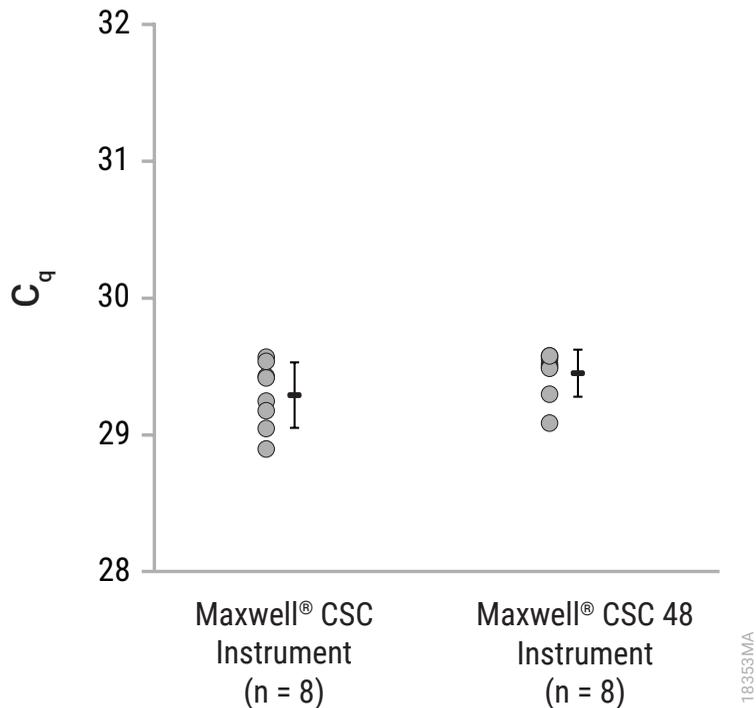


Figura 5. Amplificabilidad del ácido nucleico total extraído de muestras de esputo que contienen SARS CoV-2 utilizando Maxwell® CSC o Maxwell® CSC 48 Instrument.

El ácido nucleico total se purificó en paralelo a partir de 300 μ l y 100 μ l de muestras de lavado broncoalveolar (BAL), cada una enriquecida con 1×10^4 copias del virus SARS CoV-2 inactivado para evaluar el efecto de diferentes cantidades de matriz de muestra en la amplificabilidad. El ácido nucleico total se eluyó en 100 μ l de tampón de elución y se usaron 5 μ l de cada eluato sin diluir en un ensayo de RT-qPCR para amplificar una secuencia de ARN diana específica del SARS CoV-2. Todos los valores de C_q para el ácido nucleico total purificado a partir de 300 μ l de esputo fueron $\leq 30,86$ ciclos, con un promedio de C_q de 30,56 ciclos. Todos los valores de C_q para el ácido nucleico total purificado a partir de 100 μ l de BAL fueron $\leq 29,93$ ciclos, con un promedio de C_q de 29,74 ciclos.

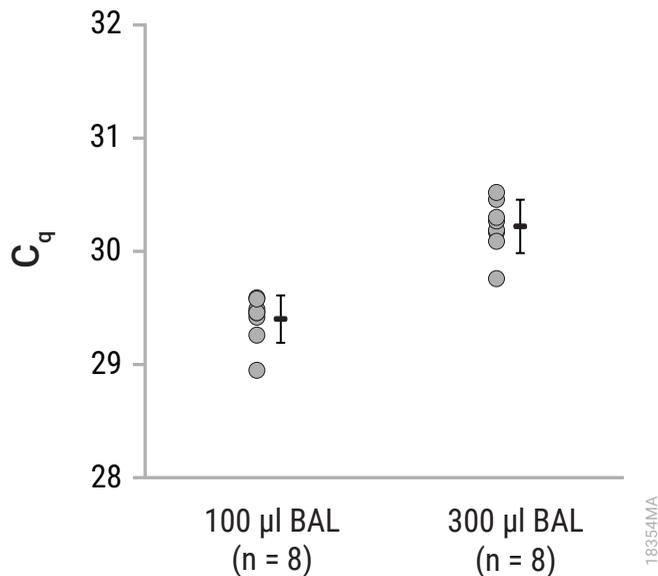


Figura 6. Amplificación de la secuencia de ARN diana del SARS CoV-2 utilizando el ácido nucleico total extraído de diferentes volúmenes de entrada de muestras.

9.C. Reproducibilidad

Para evaluar la reproducibilidad de la extracción de ácido nucleico total con el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit entre usuarios, tres usuarios preprocesaron cada uno cinco réplicas de 300 µl de medio de transporte universal (UTM, por sus siglas en inglés) enriquecido con *Bordetella pertussis* y extrajeron el ácido nucleico total en la misma ejecución de Maxwell® CSC Instrument. Los ácidos nucleicos se eluyeron en 100 µl de tampón de elución. Se usaron cinco microlitros del eluato sin diluir en un ensayo de qPCR para amplificar una secuencia de ADN diana específica de *B. pertussis*, y se calcularon el promedio de C_q y la desviación estándar. La purificación total de ácidos nucleicos fue reproducible, con desviaciones estándar de 0,31 ciclos (Usuario 1), 0,23 ciclos (Usuario 2) y 0,40 ciclos (Usuario 3). En los tres usuarios, la desviación estándar fue de 0,32 ciclos.

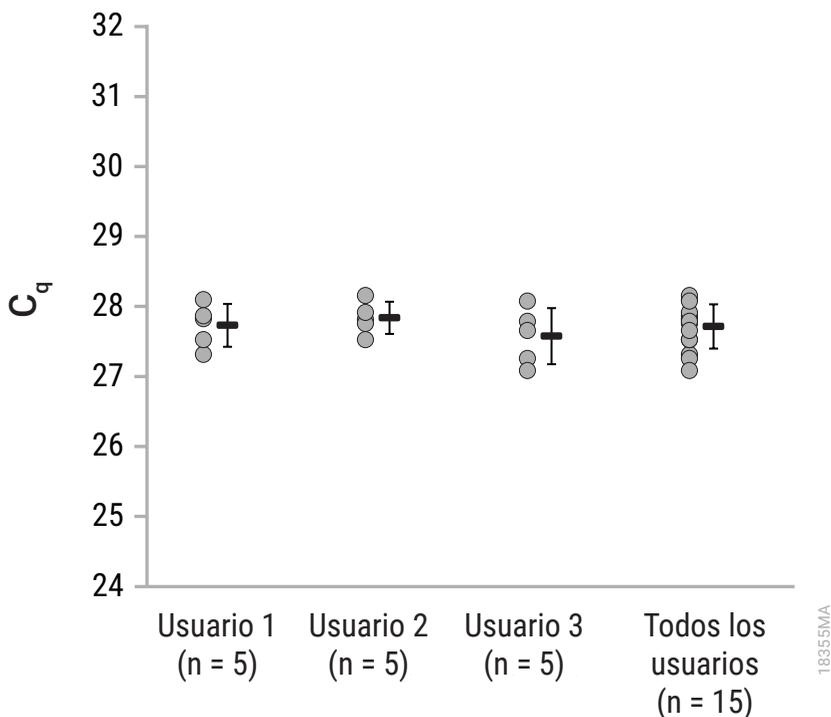


Figura 7. Reproducibilidad de la extracción de ácidos nucleicos totales entre tres usuarios.

Para evaluar la reproducibilidad de la extracción de ácido nucleico total entre diferentes ejecuciones de extracción, un solo usuario realizó tres ejecuciones de extracción de ácido nucleico total diferentes, cada una con ocho réplicas de 300 μ l de UTM enriquecido con *B. pertussis* utilizando el Maxwell[®] CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit con Maxwell[®] CSC Instruments. El ácido nucleico total se eluyó en 100 μ l de tampón de elución durante cada una de las tres ejecuciones separadas. Se usaron cinco microlitros del eluato sin diluir en un ensayo de qPCR para amplificar una secuencia de ADN diana específica de *B. pertussis*, y se calcularon el C_q promedio y la desviación estándar. La purificación total de ácidos nucleicos fue reproducible, con desviaciones estándar de 0,25 ciclos (Ejecución 1), 0,40 ciclos (Ejecución 2) y 0,22 ciclos (Ejecución 3). En las tres ejecuciones, la desviación estándar fue de 0,43 ciclos.

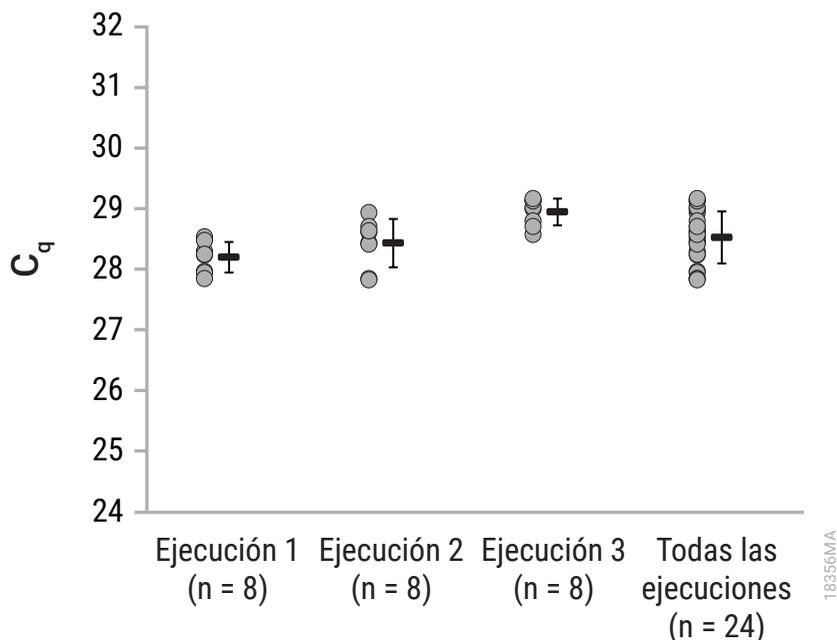


Figura 8. Reproducibilidad de la extracción de ácidos nucleicos totales entre tres ejecuciones de extracción hechas por un solo usuario.

9.C. Reproducibilidad (continuación)

Para evaluar la reproducibilidad de la extracción de ácido nucleico total entre diferentes lotes del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit, el ácido nucleico total se purificó a partir de 300 µl de réplicas de UTM enriquecidas con *B. pertussis* usando tres lotes de kits, cada uno con lotes únicos de reactivos. Cada eluato sin diluir se usó en un ensayo de qPCR para amplificar una secuencia de ADN diana específica para *B. pertussis*, y se calcularon el C_q promedio y la desviación estándar. La desviación estándar de los valores de C_q generados con el Lote 1 fue de 0,38 ciclos; el Lote 2 fue de 0,30 ciclos; y el Lote 3 fue de 0,35 ciclos. La desviación estándar de C_q en los tres lotes fue de 0,34 ciclos.

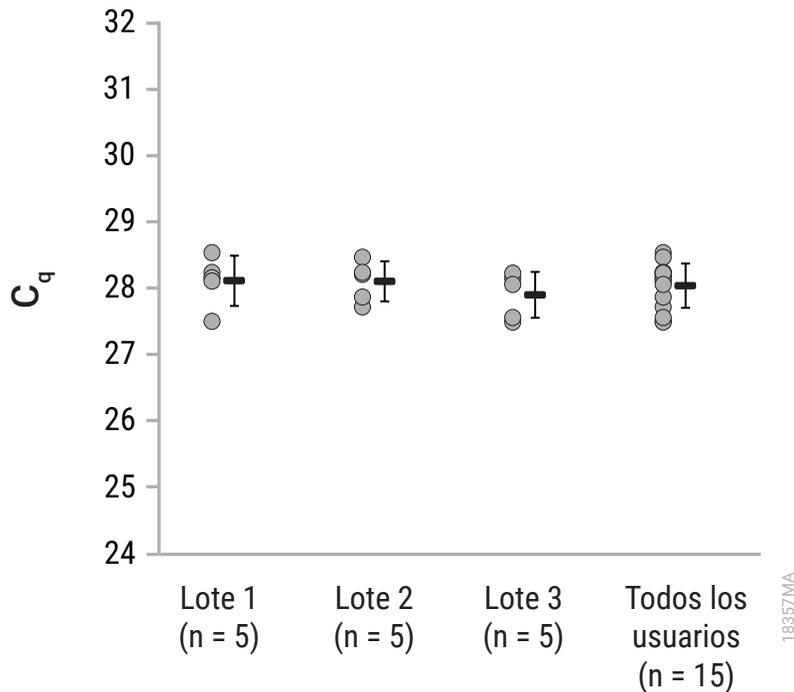


Figura 9. Reproducibilidad de la extracción de ácido nucleico total en tres lotes diferentes del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.

9.D. Inhibición de la amplificación debida a sustancias que interfieren

Para evaluar cualquier inhibición en la amplificación debida a sustancias que interfieren y que copurifican con el ácido nucleico, se purificó el ácido nucleico total a partir de ocho réplicas de 300 µl de una suspensión de heces enriquecida con 3×10^4 células de *Clostridium difficile* inactivado. Se usaron cinco microlitros de cada eluato de ácido nucleico total sin diluir y 5 µl de una dilución diez veces mayor de cada eluato en un ensayo de qPCR para amplificar un objetivo de ADN específico para *C. difficile* para evaluar el efecto de las sustancias que interfieren. Para Maxwell® CSC Instrument, todos los valores de C_q para los eluatos sin diluir fueron $\leq 27,57$ ciclos, con un C_q promedio de 26,93 ciclos. Para Maxwell® CSC 48 Instrument, todos los valores de C_q para los eluatos sin diluir fueron $\leq 27,24$ ciclos, con un C_q promedio de 27,03 ciclos. Se compararon los valores de C_q de eluatos sin diluir y eluatos diluidos diez veces para evaluar la inhibición dentro de eluatos individuales con un ΔC_q esperado de $>2,5$ ciclos, lo que indica que no hay inhibición. El ΔC_q de eluatos sin diluir y diluidos diez veces para muestras individuales osciló entre 3,24 y 3,59, lo que indica que las sustancias que interfieren presentes en el eluato provocan una inhibición mínima.

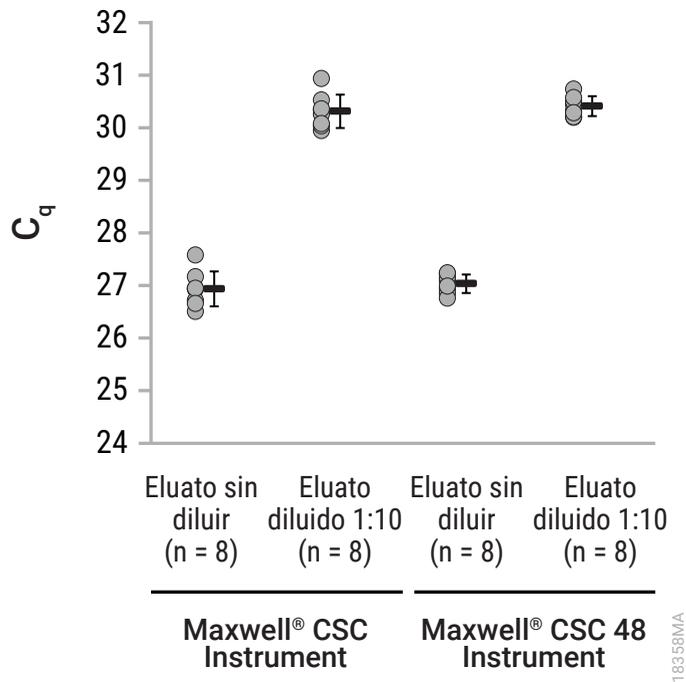


Figura 10. Evaluación de la inhibición de la amplificación del ácido nucleico total extraído con Maxwell® CSC o Maxwell® CSC 48 Instrument.

9.D. Inhibición de la amplificación debida a sustancias que interfieren (continuación)

El ácido nucleico total se extrajo de ocho réplicas de 300 µl de muestras de esputo o BAL enriquecidas con 9×10^4 copias de *Chlamydia pneumoniae* inactivado y eluidas en 100 µl de tampón de elución. Se usaron cinco microlitros de cada eluato de ácido nucleico total sin diluir y 5 µl de una dilución diez veces mayor de cada eluato en un ensayo de qPCR para amplificar un objetivo de ADN específico para *C. pneumoniae* para evaluar el efecto de las sustancias que interfieren.

Todos los valores de C_q para los eluatos de ácido nucleico total sin diluir del esputo fueron $\leq 26,59$ ciclos, con un promedio de C_q de 26,48 ciclos. El valor promedio de C_q para la dilución 1:10 de eluatos de ácido nucleico total del esputo fue de 29,83 ciclos, con una diferencia entre los valores promedio de C_q para muestras diluidas y sin diluir de 3,35 ciclos. Todos los valores de C_q para eluatos sin diluir de BAL fueron $\leq 26,64$ ciclos, con un C_q promedio de 26,41 ciclos. El valor promedio de C_q para la dilución 1:10 de eluatos de ácido nucleico total del BAL fue de 29,83 ciclos, con una diferencia de 3,42 ciclos entre los valores promedio de C_q para las muestras diluidas y sin diluir, lo que indica que cualquier sustancia que interfiera presente en el eluato provoca una inhibición mínima.

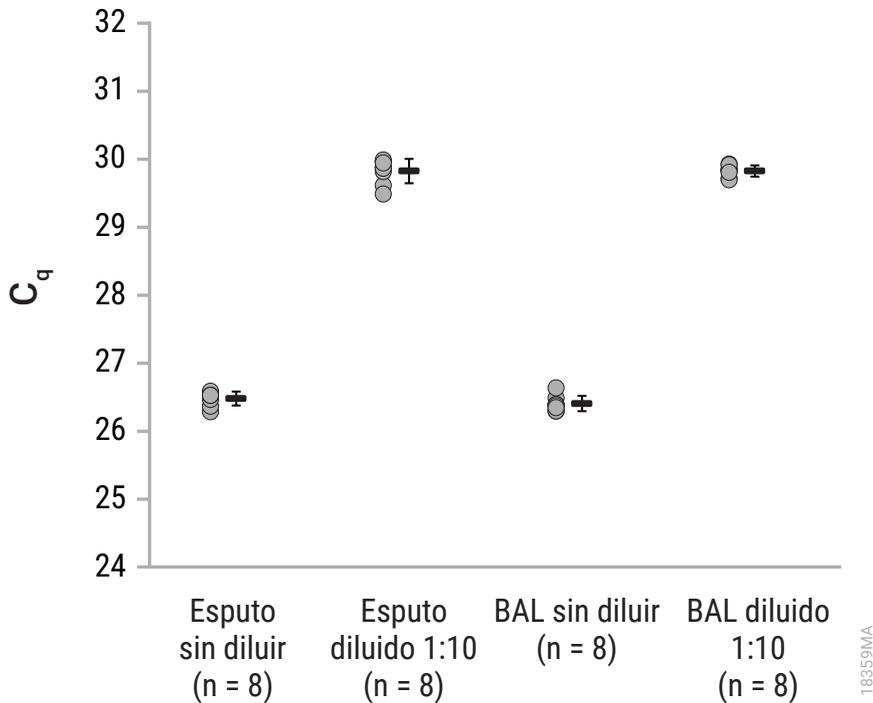


Figura 11. Evaluación de la inhibición de la amplificación del ácido nucleico total extraído de muestras de esputo y BAL.

La inhibición de la amplificación se evaluó extrayendo el ácido nucleico total de muestras de UTM enriquecidas con *B. pertussis* inactivado y amplificando el ácido nucleico total resultante mediante qPCR. En resumen, el ácido nucleico total se extrajo de ocho réplicas de 300 µl de UTM enriquecido con aproximadamente 1×10^4 copias de *B. pertussis* inactivado y se eluyó en 100 µl de tampón de elución. Se usaron cinco microlitros de cada eluato de ácido nucleico total sin diluir y 5 µl de una dilución diez veces mayor de cada eluato en un ensayo de qPCR para amplificar un objetivo de ADN específico para *B. pertussis* para evaluar el efecto de las sustancias que interfieren. El C_q promedio para eluatos sin diluir obtenidos de muestras UTM fue de 25,97 ciclos. El C_q promedio para una dilución 1:10 de los eluatos fue de 29,49 ciclos, con una diferencia de 3,52 ciclos entre los valores promedio de C_q para las muestras diluidas y sin diluir, lo que indica que cualquier sustancia que interfiera presente en el eluato provoca una inhibición mínima.

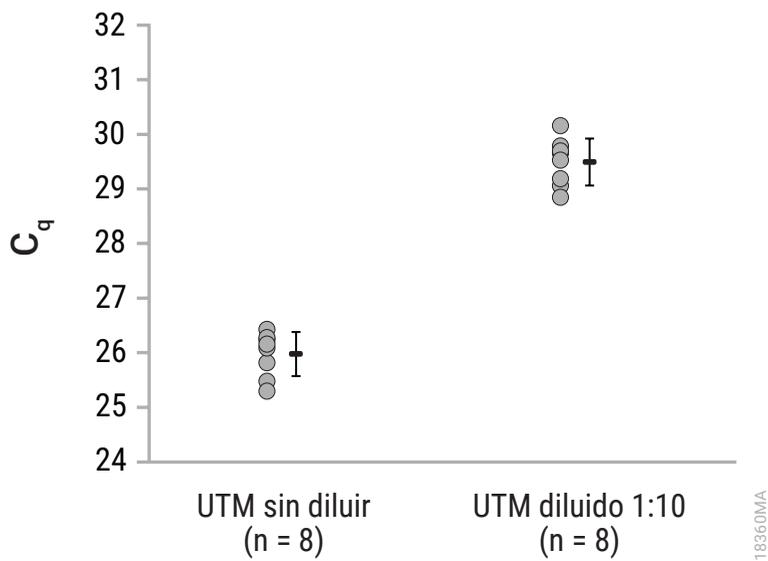


Figura 12. Evaluación de la inhibición de la amplificación del ácido nucleico total extraído de muestras UTM enriquecidas con *B. pertussis*.

9.D. Inhibición de la amplificación debida a sustancias que interfieren (continuación)

La inhibición de la amplificación se evaluó extrayendo el ácido nucleico total de las muestras de UTM enriquecidas con el virus del herpes simple 1 (HSV-1) inactivado. El ácido nucleico total se extrajo de ocho réplicas de 300 μ l de UTM enriquecidas con aproximadamente 1×10^5 copias de HSV-1 inactivado y se eluyó en 100 μ l de tampón de elución. Se usaron cinco microlitros de cada eluato de ácido nucleico total sin diluir y 5 μ l de una dilución diez veces mayor de cada eluato en un ensayo de qPCR para amplificar un objetivo de ADN específico para HSV-1 para evaluar el efecto de las sustancias que interfieren. Todos los valores de C_q para eluatos sin diluir fueron $\leq 27,25$ ciclos, con un C_q promedio de 26,88 ciclos. El ΔC_q de eluatos sin diluir y diluidos diez veces para muestras individuales osciló entre 3,44 y 3,91, lo que indica que las sustancias que interfieren presentes en el eluato provocan una inhibición mínima.

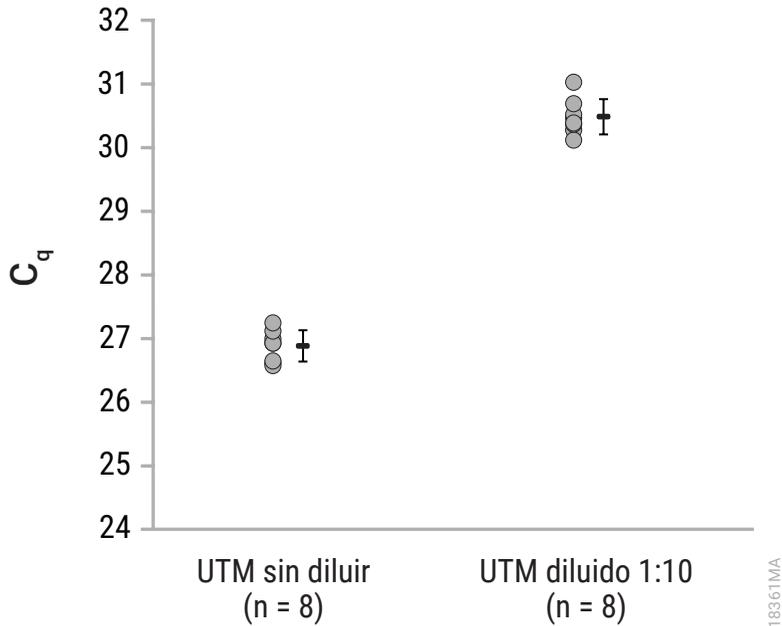


Figura 13. Evaluación de la inhibición de la amplificación del ácido nucleico total extraído de muestras UTM enriquecidas con HSV-1.

9.E. Contaminación cruzada

La contaminación cruzada se evaluó utilizando el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit con el Maxwell® CSC Instrument alternando los cartuchos Maxwell® CSC que contenían muestras UTM enriquecidas con *B. pertussis* inactivado y muestras UTM negativas sin *B. pertussis* añadida en la bandeja de plataforma Maxwell® en una sola ejecución de extracción de ácido nucleico total. Los eluatos de muestras UTM positivas y negativas de *B. pertussis* se usaron en un ensayo de qPCR para amplificar un objetivo de ADN diana de *B. pertussis* y los valores de C_q resultantes se compararon con una curva estándar (10^1 – 10^6 copias) generada usando diluciones en serie de un ADN sintético con la secuencia diana de *B. pertussis*. Todos los eluatos de UTM con *B. pertussis* añadida tenían valores de C_q dentro de la curva estándar, con un C_q medio de 25,42 ciclos. Todos los eluatos UTM negativos sin *B. pertussis* añadida tenían valores de C_q superiores a los C_q obtenidos para la concentración de ADN más baja de la curva estándar (10 copias).

10. Evaluación del rendimiento clínico

La evaluación del rendimiento clínico del Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit la hizo un laboratorio clínico externo utilizando el Maxwell® CSC 48 instrument para extraer el ácido nucleico del patógeno de los tipos de muestras clínicas que se especifican abajo y amplificar el ácido nucleico en un ensayo clínicamente relevante.

Tabla 2. Extracción de ácido nucleico total de *Clostridium difficile* de muestras de heces. Un probador extrajo el ácido nucleico total de 200 mg de cada una de diez muestras de heces humanas positivas para *Clostridium difficile* (*C. difficile*) y diez negativas para *C. difficile* utilizando el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. También se purificó el ácido nucleico de estas muestras usando el método de purificación estándar del laboratorio como referencia. Los eluatos resultantes se analizaron amplificando los objetivos de ADN de la toxina A y la toxina B de *C. difficile* en un ensayo qPCR. El ácido nucleico extraído de todas las muestras presuntamente negativas para *C. difficile* y positivas para *C. difficile* purificado con el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit dio el resultado esperado y demostró concordancia con los resultados obtenidos del ácido nucleico extraído con el método de extracción de referencia del laboratorio.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Método de referencia del laboratorio
Muestras que coinciden con el estado negativo de <i>C. difficile</i>	10/10	10/10
Muestras que coinciden con el estado positivo de <i>C. difficile</i>	10/10	10/10

Tabla 3. Extracción de ácido nucleico total de citomegalovirus de muestras de lavado broncoalveolar (BAL). Un probador extrajo el ácido nucleico total de diez muestras de BAL humano positivas para citomegalovirus (CMV) (100 µl y 300 µl) y diez negativas para CMV (300 µl) utilizando el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Además, se extrajo el ácido nucleico total de 300 µl de las mismas diez muestras de BAL positivas para CMV y diez negativas para CMV utilizando el método de purificación estándar del laboratorio como referencia. Los eluatos resultantes se analizaron amplificando el objetivo de ADN del gen temprano inmediato principal de CMV en un ensayo de qPCR. El ácido nucleico extraído de todas las muestras presuntamente negativas para CMV y positivas para CMV (tanto de 100 µl como de 300 µl) purificado con el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit dio el resultado esperado y demostró concordancia con los resultados obtenidos a partir de ácido nucleico extraído utilizando el método de extracción de referencia del laboratorio.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Método de referencia del laboratorio
Muestras que coinciden con el estado de CMV negativo	10/10 para un volumen de entrada de 300 µl	10/10 para un volumen de entrada de 300 µl
Muestras que coinciden con el estado de CMV positivo	10/10 para un volumen de entrada de 100 µl 10/10 para un volumen de entrada de 300 µl	10/10 para un volumen de entrada de 300 µl

Tabla 4. Extracción de ácido nucleico total de SARS-CoV-2 de muestras de medio de transporte viral (VTM, por sus siglas en inglés). Dos probadores extrajeron el ácido nucleico total de 300 µl de VTM que contenía una muestra de hisopado nasofaríngeo. Dos probadores extrajeron el ácido nucleico total de diez muestras de SARS CoV-2 de VTM humanas positivas y diez de SARS CoV-2 negativas utilizando el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Un probador también extrajo ácido nucleico de las mismas muestras utilizando el método de purificación estándar del laboratorio como referencia. Los eluatos resultantes se analizaron amplificando los genes RdRP y N del SARS CoV-2 en un ensayo de RT-qPCR. El ácido nucleico extraído de todas las muestras de SARS CoV-2 negativas y de SARS CoV-2 positivas purificado por ambos probadores con el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit dio el resultado esperado y demostró concordancia con los resultados obtenidos del ácido nucleico extraído con el método de extracción de referencia del laboratorio.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Método de referencia del laboratorio
Muestras que coinciden con el estado negativo de SARS-CoV-2	10/10 para el probador A 10/10 para el probador B	10/10
Muestras que coinciden con el estado positivo de SARS-CoV-2	10/10 para el probador A 10/10 para el probador B	10/10

Tabla 5. Extracción de ácido nucleico total del virus del papiloma humano a partir de muestras de medio de

Papanicolaou. Un probador extrajo el ácido nucleico total de 300 µl de muestras de medio ThinPrep® PAP que contenían cepillado cervical recolectado de pacientes humanos. El ácido nucleico total se extrajo de nueve muestras de medio de Papanicolaou positivas para el virus del papiloma humano (VPH) y nueve negativas para el VPH con el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. También se extrajo ácido nucleico de las mismas muestras utilizando el método de purificación estándar del laboratorio como referencia. Los eluatos resultantes se analizaron amplificando los objetivos de ADN de VPH-16, VPH-18 y PVH. de alto riesgo en un ensayo de qPCR. El ácido nucleico extraído de todas las muestras de medio de Papanicolaou positivas para VPH extraídas con el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit dio el resultado esperado y demostró concordancia con los resultados obtenidos del ácido nucleico extraído con el método de extracción de referencia del laboratorio.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Método de referencia del laboratorio
Muestras que coinciden con el estado de VPH negativo	9/9	9/9
Muestras que coinciden con el estado de VPH positivo	9/9	9/9

Tabla 6. Extracción de ácido nucleico total de citomegalovirus de muestras de orina. Un probador extrajo el ácido nucleico total de 300 µl cada una de diez muestras de orina humana positivas para CMV y diez negativas para CMV utilizando el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. También se extrajo ácido nucleico de las mismas muestras utilizando el método de purificación estándar del laboratorio como referencia. Los eluatos resultantes se analizaron amplificando el objetivo de ADN del gen temprano inmediato principal de CMV en un ensayo de qPCR. Todas las muestras de orina humana negativas para CMV y nueve de las diez muestras de orina humana positivas para CMV demostraron concordancia con los resultados obtenidos utilizando ácido nucleico extraído mediante el método de extracción de referencia del laboratorio. Una muestra de orina supuestamente positiva para CMV fue discordante entre los dos métodos de purificación con un resultado negativo para el sistema de purificación Maxwell® CSC y un resultado positivo débil (C_q más bajo de 36,26 para cuatro repeticiones con un resultado positivo de un total de cinco repeticiones analizadas) utilizando el método de referencia del laboratorio.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Método de referencia del laboratorio
Muestras que coinciden con el estado de CMV negativo	10/10	10/10
Muestras que coinciden con el estado de CMV positivo	9/10	10/10

Tabla 7. Extracción de ácido nucleico total de citomegalovirus de muestras de plasma. Un probador extrajo el ácido nucleico total de 300 µl cada una de diez muestras de plasma humana positivas para CMV y diez negativas para CMV utilizando el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. También se extrajo ácido nucleico de las mismas muestras utilizando el método de purificación estándar del laboratorio como referencia. Los eluatos resultantes se analizaron amplificando el objetivo de ADN del gen temprano inmediato principal de CMV en un ensayo de qPCR. El ácido nucleico extraído de todas las muestras de plasma humano negativas para CMV y positivas para CMV purificados con el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit dio el resultado esperado y demostró concordancia con los resultados obtenidos del ácido nucleico extraído usando el método de extracción de referencia de laboratorio.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Método de referencia del laboratorio
Muestras que coinciden con el estado de CMV negativo	10/10	10/10
Muestras que coinciden con el estado de CMV positivo	10/10	10/10

Se evaluó la contaminación cruzada que se producía en el entorno del usuario previsto utilizando el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit alternando los cartuchos Maxwell® CSC que contenían muestras de plasma humano positivas para CMV y negativas para CMV en la bandeja de la plataforma Maxwell® CSC 48 Instrument en una sola ejecución de extracción de ácido nucleico total. No se observó contaminación cruzada ya que las muestras negativas dieron un resultado negativo en un ensayo de qPCR para un objetivo de ADN de CMV.

11. Creación de un entorno sin ribonucleasa

Las ribonucleasas son extremadamente difíciles de desactivar. Tenga cuidado de evitar la introducción de actividad de ARNasa en las muestras de ácido nucleico total que contienen ARN durante y después del aislamiento. Esto es especialmente importante si el material de inicio fue difícil de obtener o es irremplazable. Las siguientes indicaciones le ayudarán a evitar la contaminación accidental de sus muestras con ARNasa.

1. Dos de las fuentes más frecuentes de contaminación con ARNasa son las manos del usuario y las bacterias u hongos que puede haber en las partículas de polvo en suspensión. Para evitar la contaminación con estas fuentes, utilice una técnica que garantice la esterilidad cuando deba manipular los reactivos suministrados con este sistema. Utilice guantes en todo momento. Cambie de guantes siempre que pueda haber entrado en contacto con ribonucleasas.
2. Siempre que sea posible, deben utilizarse instrumentos de plástico estériles y desechables para manejar el ácido nucleico total que contiene ARN. Estos materiales suelen carecer de ARNasa y no necesitan pretratamiento para desactivarla.
3. Trate los instrumentos de vidrio y de plástico y las cámaras de electroforesis no estériles antes de utilizarlos para asegurarse de que carezcan de ARNasa. Caliente los instrumentos de vidrio en el horno a 200 °C durante toda la noche y enjuague a fondo los instrumentos de plástico con 0,1 N de NaOH y 1 mM de EDTA, seguido de agua sin ARNasa. También pueden emplearse productos de eliminación de ARNasa convencionales, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Nota: las cámaras de electroforesis pueden estar contaminadas con ribonucleasas, concretamente con ARNasa A, del análisis de muestras de ADN. Siempre que sea posible, aparte los aparatos nuevos o descontaminados para utilizarlos únicamente para el análisis del ARN.

4. Trate las soluciones no suministradas con el sistema añadiendo pirocarbonato de dietilo (DEPC) al 0,1 % v/v en una campana extractora. Incúbelas durante toda la noche a temperatura ambiente en la campana extractora, removiendo cada cierto tiempo. Trátelas en el autoclave durante 30 minutos para eliminar cualquier resto de DEPC.



Precaución: el DEPC es un posible carcinógeno, por lo que solo debería usarse en una campana extractora para productos químicos. El DEPC reacciona rápidamente con las aminas y no puede utilizarse para tratar tampones de Tris.

Nota: para todas las aplicaciones posteriores, es crucial que siga protegiendo sus muestras de ARN de las ARNasas. Utilice guantes limpios y emplee soluciones sin ARNasa y tubos de centrifuga.



12. Bibliografía

1. Clinical Laboratory Standards Institute (2020) CLSI MM13–Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods. Segunda edición.
2. Baron, E.J. (2015) Specimen collection, transport, and processing: Bacteriology. En: *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*. Consultado el 2 de noviembre de 2022: www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html
4. Centers for Disease Control and Prevention. *Stool Specimens - Molecular Diagnosis*. Consultado el 2 de noviembre de 2022: www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/stool/moleculardx.html

13. Solución de problemas

En caso de que tenga alguna duda que no resuelva esta sección, póngase en contacto con su distribuidor o sucursal local de Promega. Puede ver la información de contacto en: www.promega.com. Correo electrónico: techserv@promega.com

Síntomas	Causas y comentarios
<p>Recuperación de ácido nucleico de patógenos inferior a la esperada (por ejemplo, para los controles internos proporcionados por el cliente)</p>	<p>La integridad de las muestras iniciales se vio comprometida. Asegúrese de que las muestras se recogieron, enviaron y almacenaron de acuerdo con los procedimientos recomendados.</p> <hr/> <p>Para las muestras de ARN viral, asegúrese de que se dan condiciones sin ARNasa para la preparación de la muestra y la configuración del análisis, incluidos tubos libres de ARNasa y puntas de pipeta.</p> <hr/> <p>El paso de procesamiento no fue óptimo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Utilice solamente el tampón lítico proporcionado con este kit. • Una mezcla incompleta puede reducir la lisis. Mezcle la muestra con la solución lítica mediante un vórtex, como se recomienda. • Tratamiento incompleto de proteasas para eliminar cápsides virales y/o proteínas de bacterias y parásitos. Compruebe el bloque calefactado o la temperatura del baño de agua, e incube durante el tiempo completo que se recomienda. • Cuando se trabaja con patógenos difíciles de lisar (bacterias Gram-positivas o parásitos) en las heces, se puede utilizar el paso opcional de batido de perlas. • Asegúrese de que se haya agregado 1-tioglicerol para el BAL o el preprocesamiento de la muestra de esputo. Omitir 1-tioglicerol puede afectar negativamente a los rendimientos. • La adición de más muestra que la recomendada puede reducir la recuperación de ácido nucleico. <hr/> <p>Compruebe que se haya añadido un émbolo al cartucho.</p>

13. Solución de problemas (continuación)

Síntomas	Causas y comentarios
Recuperación de ácido nucleico de patógenos inferior a la esperada (por ejemplo, para los controles internos proporcionados por el cliente) (continuación)	<p>Problemas de almacenamiento tras la purificación.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Retire los eluatos y almacénelos a la temperatura recomendada inmediatamente después de la ejecución del Maxwell® Instrument. • No someta los eluatos a ciclos repetitivos de congelación-descongelación antes de los análisis posteriores.
Amplificación pobre	<p>Es posible que el sistema no purifique de forma eficiente los controles internos de ácido nucleico con tamaño inferior a 100 bp. El usuario es responsable de establecer el rendimiento de cualquier control interno.</p> <hr/> <p>El arrastre de partículas paramagnéticas puede provocar interferencias en las reacciones de amplificación. Elimine las partículas del tubo de elución mediante un centrifugado o separación magnética.</p> <hr/> <p>Se ha añadido un tampón de elución incorrecto. Utilice únicamente el tampón de elución suministrado con el Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.</p>
Contaminación cruzada	<p>Utilice puntas de pipeta nuevas para cada muestra para evitar la contaminación entre muestras.</p> <hr/> <p>Evite provocar salpicaduras cuando añada los lisados a los cartuchos. Los cartuchos pueden retirarse de la bandeja de plataforma para la adición de muestras con el fin de minimizar la contaminación de los cartuchos adyacentes.</p>
El instrumento no puede recoger los émbolos	<p>Asegúrese de que está utilizando un kit químico específico para Maxwell® CSC; los émbolos de los kits de reactivos de Maxwell® CSC son específicos para los Maxwell® Instruments con este kit.</p>

Se deberá comunicar de inmediato al fabricante todo suceso grave que se produjera en relación con el producto y que provocara (o pudiera provocar) la muerte o una lesión grave a un usuario o paciente. Los usuarios residentes en la Unión Europea también deberán notificar todo suceso grave a la autoridad competente del Estado miembro en el que resida el usuario y/o el paciente.

14. Productos relacionados

Instrumentos y accesorios

Producto	Tamaño	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument	1 unidad	AS6000
Maxwell® CSC 48 Instrument	1 unidad	AS8000
Maxwell® RSC/CSC Plungers, 50 paquetes	1 unidad	AS1331
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 unidad	SP6019
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 unidad	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 unidad	AS8402
ClickFit Microtube, 1,5 ml	1000/paquete	V4741

Maxwell® CSC Reagent Kits

Para obtener una lista de los kits de purificación de Maxwell® CSC disponibles, visite: www.promega.com

®Número de patente de EE. UU. 7 329 488 y número de patente de Corea del Sur 100483684.

© 2022 Promega Corporation. Todos los derechos reservados.

Maxwell es una marca registrada de Promega Corporation.

ThinPrep es una marca registrada de Hologic, Inc.

Estos productos podrían estar protegidos mediante patentes emitidas o pendientes, o podrían tener algunas limitaciones. Para obtener más información, visite nuestro sitio web. Todos los precios y especificaciones de este manual están sujetos a cambios sin previo aviso.

Las declaraciones sobre los productos están sujetas a cualquier cambio. Póngase en contacto con Promega Technical Services o acceda al catálogo en línea de Promega para obtener la información más actual sobre los productos Promega.