

TECHNISCHES HANDBUCH

Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Gebrauchsanweisung für das Produkt
AS1860

Achtung: Kartuschen vorsichtig handhaben. Folienversiegelungen können scharfkantig sein.



GEBRAUCHSANWEISUNG
FÜR DAS PRODUKT

AS1860



PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Deutschland

Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Die gesamte technische Literatur ist unter folgender Adresse erhältlich: www.promega.com/protocols/
 Rufen Sie diese Website auf. Dort finden Sie die jeweils aktuelle Version dieses technischen Handbuchs.
 Schreiben Sie eine E-Mail an Promega Technical Services, falls Sie Fragen zur Verwendung dieses Systems haben.
 Die E-Mail-Adresse lautet: techserv@promega.com

1. Beschreibung	2
2. Produktkomponenten und Lagerbedingungen	3
3. Verwendungszweck des Produkts	5
4. Anwendungstechnische Grenzen des Produkts	5
5. Bevor Sie beginnen	6
6. Probenvorbereitung	7
6.A. Vorbereitung von Stuhlproben zur Verwendung mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	7
6.B. Vorbereitung von BAL- oder Sputum-Proben zur Verwendung mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	8
6.C. Vorbereitung von Urinproben zur Verwendung mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	9
6.D. Vorbereitung von Plasma-, Virustransportmedien- oder Pap-Medien-Proben zur Verwendung mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	10
6.E. Vorbereiten der Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge	10
7. Einrichtung und Betrieb des Maxwell® Instruments	12
8. Lagerung eluierter Nukleinsäure	14
9. Evaluierung der analytischen Leistung	15
9.A. Quantität, Qualität und Amplifizierbarkeit der DNA	15
9.B. RNA-Quantität, -Qualität und -Amplifizierbarkeit	16
9.C. Reproduzierbarkeit	18
9.D. Amplifikationshemmung durch Störsubstanzen	21
9.E. Kreuzkontamination	25
10. Evaluierung der klinischen Leistung	25
11. Erstellen einer ribonukleasefreien Umgebung	29
12. Literaturhinweise	29
13. Fehlerbehebung	30
14. Verwandte Produkte	31

Das Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit ist nur in bestimmten Ländern erhältlich.

1. Beschreibung

Das Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit^(a) bietet in Kombination mit den in Tabelle 1 angegebenen Maxwell®-Instrumenten eine einfache Methode zur effizienten automatischen Probenvorbereitung und Aufreinigung pathogener Gesamtnukleinsäure. Die Maxwell® CSC Instrumente wurden im Sinne maximaler Einfachheit und Zweckdienlichkeit für den Einsatz mit vorbereiteten Reagenzien-Kartuschen und vorprogrammierten Aufreinigungsverfahren entwickelt. Das Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit wurde für die automatisierte Extraktion bakterieller, viraler und parasitärer Gesamtnukleinsäure aus den folgenden humanen biologischen Proben entwickelt: Stuhl, Sputum, bronchoalveoläre Lavage, Urin, Plasma, Nasopharyngealabstriche und Zervikalabstriche in Transportmedium. Mit der Maxwell®-Instrument-Methode für das Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit kann in ca. 40 Minuten eine oder mehrere Proben (bis zur maximalen Anzahl) auf dem Maxwell® Instrument verarbeitet werden. Das geringe Elutionsvolumen von 100 µl ergibt eine konzentrierte aufgereinigte Nukleinsäure für nachfolgende Anwendungen, wie z. B. die quantitative PCR (qPCR) oder quantitative RT-PCR (RT-qPCR). Nach einem kurzen Lyse-Vorverarbeitungsschritt wird die Probe in die Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge gegeben. Die restliche Verarbeitung erfolgt vollautomatisch.

Tabelle 1. Unterstützte Geräte.

Gerät	Cat.#	Technisches Handbuch
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

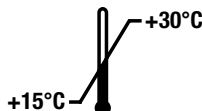
Prinzip der Methode

Das Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit reinigt Proben mithilfe paramagnetischer Partikel, die für eine mobile feste Phase sorgen, mit der die Nukleinsäure optimal aus der Probe gewonnen, gewaschen und aufgereinigt wird. Maxwell® Instrumente sind Geräte zur magnetischen Partikelhandhabung, welche die Nukleinsäure effizient an die paramagnetischen Partikel in der ersten Kammer einer vorgefüllten Kartusche binden. Die Proben werden einer Reihe von Waschungen unterzogen, bevor die Gesamtnukleinsäure eluiert wird.

2. Produktkomponenten und Lagerbedingungen

PRODUKT	GRÖSSE	CAT. #
Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	48 Präparationen	AS1860

Für den Einsatz in der In-vitro-Diagnostik. Verwendung nur durch Fachpersonal. Reicht für 48 Isolationen. Die Kartuschen sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt.



Beinhaltet:

- 150 ml Dilution Buffer (ST1)
- 900 µl 1-Thioglycerol
- 20 ml Lyse-Pufferlösung
- 2 x 1 ml Proteinase K-(PK-)Lösung
- 50 CSC/RSC-Stößel
- 48 Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ)
- 50 Elutions-Gefäße (0,5 ml)
- 20 ml Elutions-Pufferlösung

Lagerbedingungen: Entnehmen Sie das 1-Thioglycerin bei Erhalt des Kits und lagern Sie es bei +2 °C bis +10 °C.

Lagern Sie die übrigen Kit-Komponenten bei Raumtemperatur (+15 °C bis +30 °C).



Sicherheitshinweise: Die Kartuschen enthalten Ethanol, Isopropanol und Guanidinhydrochlorid. Ethanol und Isopropanol gelten als leichtentzündlich, gesundheitsschädlich und reizend. Guanidinhydrochlorid gilt als giftig, gesundheitsschädlich und reizend. Ausführliche Sicherheitshinweise finden Sie im SDS.



Die Kartuschen sind zum Gebrauch mit potenziell infektiösen Substanzen bestimmt. Bei der Handhabung infektiöser Substanzen ist angemessene Schutzkleidung (z. B. Handschuhe und Schutzbrille) zu tragen. Beim Umgang mit allen infektiösen Substanzen in Verbindung mit diesem System und bei deren Entsorgung sind die Richtlinien Ihres Instituts zu befolgen.

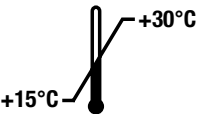


Achtung: Kartuschen vorsichtig handhaben; Kanten können scharf sein.

Weitere Informationen: Die Komponenten des Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit sind für den gemeinsamen Gebrauch vorgesehen und haben eine Qualitätskontrollprüfung durchlaufen. Kit-Komponenten verschiedener Chargen dürfen **nicht** miteinander vermischt werden. Verwenden Sie nur die in dem Kit enthaltenen Komponenten. Kartuschen nicht verwenden, wenn die Kartuschenversiegelung bei Erhalt nicht intakt ist. Weitere Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt unter: **www.promega.com**

2. Produktkomponenten und Lagerbedingungen (Fortsetzung)

Erklärung der Symbole

Symbol	Erklärung	Symbol	Erklärung
	In-vitro-Diagnostikum		Nicht zur Wiederverwendung
	Bei +15 °C bis +30 °C aufbewahren.		Hersteller
	Achtung		Leichtentzündlich
	Gesundheitsrisiko		Ausreichend für „n“ Tests
	Warnung. Quetschgefahr.		Warnung. Biogefahr.
	Chargennummer		Bestellnummer
	Europäische Konformität		Bevollmächtigter

3. Verwendungszweck des Produkts

Das Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit ist zur Verwendung in Kombination mit Maxwell® CSC-Instrumenten und der Maxwell®-CSC-Pathogen-Total-Nucleic-Acid-Methode als In-vitro-Diagnostikum (IVD) zur automatisierten Isolierung viraler, bakterieller und/oder parasitärer Gesamtnukleinsäure aus den folgenden humanen Probenotypen bestimmt: Stuhl, Sputum, bronchoalveoläre Lavage, Nasopharyngealabstriche in Transportmedien, Zervikalabstriche in Transportmedien, Urin und Plasma. Die aufgereinigte Gesamtnukleinsäure ist für den Einsatz bei auf Amplifikation basierenden In-vitro-Diagnostik-Assays geeignet.

Das Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Purification Kit ist für den Einsatz bei Temperaturen zwischen 15 °C und 30 °C bestimmt. Der Einsatz außerhalb dieses Temperaturbereichs kann zu suboptimalen Ergebnissen führen.

Das Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit ist ausschließlich zur Verwendung durch Fachpersonal bestimmt. Diagnostischen Ergebnisse, die aus der Gesamtnukleinsäure gewonnen werden, die mit diesem Gerät aufgereinigt wurde, müssen in Verbindung mit weiteren Klinik- oder Labordaten ausgewertet werden.

4. Anwendungstechnische Grenzen des Produkts

Die Leistung des Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit wurde für folgende Pathogene anhand der aufgeführten Probenotypen evaluiert:

- Bakterien: Stuhl, Sputum, bronchoalveoläre Lavage, nasopharyngeale Abstriche in Transportmedien, zervikale Abstriche in Transportmedien, Urin.
- Parasiten: Stuhl, Zervikalabstriche in Transportmedien, Urin.
- Viren: Stuhl, Sputum, bronchoalveoläre Lavage, nasopharyngeale Abstriche in Transportmedien, zervikale Abstriche in Transportmedien, Urin, Plasma.

Das Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit ist nicht zur Verwendung mit nicht-humanen Proben bestimmt.

Jede nachfolgende Diagnoseanwendung, bei der mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit aufgereinigte Gesamtnukleinsäure verwendet wird, muss geeignete Kontrollen beinhalten. Für die Validierung von Leistungsmerkmalen, die für nachfolgende Diagnostikanwendungen benötigt werden, ist der Benutzer verantwortlich.

5. Bevor Sie beginnen

Vom Benutzer bereitzustellende Materialien

- 1,5–2,0-ml-Röhrchen für die Inkubation von Proben (z. B. ClickFit Microtube, 1,5 ml [Cat.# V4741]; empfohlen, um ein Öffnen der Kappe beim Erwärmen zu verhindern)
- Konisches 15-ml- oder 50-ml-Röhrchen zur Vorbereitung der Lyse-Lösung
- Tisch-Vortexmischer
- Pipettierer und Pipettenspitzen für die Übertragung der Proben in die vorgefüllten Reagenzien-Kartuschen
- Heizblock oder Wasserbad, auf 56 °C eingestellt
- Heizblock auf 95 °C für Sputum- und BAL-Proben eingestellt
- **optional:** 1X PBS zum Verdünnen von BAL- und Sputumproben
- **optional:** Zentrifuge für die Aufbereitung von Urinproben
- **optional:** 0,1–0,5 mm große Zirkoniumperlen für die Aufbereitung von Stuhlproben (beispielsweise ZR-Bashing-Beads, Zymo [Cat. #S6012-50])
- Röhrchen für Stuhl, Sputum, bronchoalveoläre Lavage (BAL), virales Transportmedium (VTM), Pap-Medium, Plasma und Urinproben



Für den Umgang mit humanen Proben werden Vorsichtsmaßnahmen gegen durch Blut übertragbare Krankheitserreger empfohlen.

Für Plasmaproben ist das Blut in EDTA-antikoagulierten Röhrchen zu entnehmen. Die Verwendung von heparinhaltigen Blutentnahmeröhrchen ist zu vermeiden, da Heparin nachgeschaltete Amplifikationen hemmen kann.

Die folgenden allgemeinen Empfehlungen gelten für die Vorbereitung und Lagerung von Proben (Referenzen 1–4):

1. Trennen Sie das Plasma innerhalb von 1 Stunde nach der Blutabnahme von den Zellen, indem Sie es 20 Minuten lang bei 25 °C mit 1.500 × g zentrifugieren und übertragen Sie den Plasmaüberstand anschließend in ein sauberes Röhrchen. Lagern Sie Plasma maximal 24 Stunden bei 2–8 °C, oder frieren Sie nicht verwendete Proben innerhalb von 24 Stunden maximal 5 Tage bei –20 °C ein.
2. Bei Abstrichtupfern in einem VTM sind ausschließlich Tupfer aus Synthetikfaser mit Kunststoffstab zu verwenden. Verwenden Sie keine Calciumalginat-Tupfer oder Tupfer mit Holzstab, da diese Substanzen enthalten können, die PCR-Tests hemmen. Geben Sie die Tupfer sofort in sterile Röhrchen mit 2–3 ml viralem Transportmedium. Lagern Sie VTM und stabilisierte Salivaproben maximal 72 Stunden bei 2–8 °C, oder frieren Sie die Proben bei –70 °C ein. Vermeiden Sie wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen und lagern Sie die Proben nicht in einem Gefrierschrank mit automatischer Abtaufunktion. Je nach isoliertem Virus können die spezifischen Entnahme- und Lagerbedingungen unterschiedlich sein.
3. Lagern Sie frische Urinproben vor der Verarbeitung bis zu 24 Stunden bei 4 °C. Geben Sie bei längerer Lagerung EDTA bis zu einer Endkonzentration von 20 mM hinzu. Lagern Sie stabilisierten Urin bei 4 °C, um eine Zellyse zu vermeiden. Um eine Zellyse zu vermeiden, sollte Urin nicht eingefroren werden. Wenn Urin eingefroren und aufgetaut wird, kann sich ein Niederschlag bilden. Durch Mischen und/oder Erhitzen der Probe kann der Niederschlag aufgelöst werden. Vermeiden Sie das Zentrifugieren der Probe zur Entfernung des Präzipitats, da dadurch intakte pathogene Zellen entfernt werden können.

4. Lagern Sie BAL- und Sputumproben maximal 72 Stunden bei 2–8 °C, oder frieren Sie die Proben bei –70 °C ein. Vermeiden Sie wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen und lagern Sie die Proben nicht in einem Gefrierschrank mit automatischer Abtaufunktion. Je nach isoliertem Krankheitserreger können die spezifischen Entnahme- und Lagerbedingungen unterschiedlich sein.
5. Stuhlproben sollten vor der Verarbeitung bei –20 bis –80 °C eingefroren werden.

6. Probenvorbereitung

6.A. Vorbereitung von Stuhlproben zur Verwendung mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

1. Wiegen Sie 100–500 mg der Kotprobe in ein 2-ml-Schraubverschluss-Mikrozentrifugenröhrchen ein.
2. Geben Sie 1 ml Dilution Buffer (ST1) hinzu, um die Probe zu resuspendieren. 30 Sekunden bis 1 Minute lang kräftig vortexen. Verwenden Sie bei jeder Probe frische Pipettenspitzen, um eine Kontamination von Probe zu Probe zu verhindern.
3. Zentrifugieren Sie die Probe 1.000 × g für 1 Minute bei Raumtemperatur.
4. Geben Sie den Überstand in ein Röhrchen geeigneter Größe und messen Sie das Volumen.
5. Fügen Sie das 2-fache Volumen Dilution Buffer (ST1) für eine 1:2-Verdünnung der Stuhlprobe hinzu [z. B. 1 ml Stuhlüberstand + 2 ml Dilution Buffer (ST1)]. Verwenden Sie diese Stuhlprobenverdünnung für DNA-Aufreinigungen.

Hinweis: Verdünnen Sie zur Extraktion viraler RNA die Stuhlprobe 1:8 in Nuclease-Free Water (z. B. 100 µl der 1:2-Verdünnung der Stuhlprobe + 700 µl Nuclease-Free Water). Bewahren Sie die Probe bis zur Verarbeitung bei Raumtemperatur auf.

Optionale Bead-Beating-Methode zur Extraktion von DNA aus schwer lysierbaren Pathogenen in Stuhlproben

Hinweis: Zur Extraktion von Nukleinsäuren aus schwer zu lysierenden Krankheitserregern wie grampositiven Bakterien oder Protozoen in Stuhlproben kann optional ein Bead-Beating-Schritt erfolgen. Diese zusätzliche Homogenisierung kann die Ausbeute der Nukleinsäureaufreinigung erhöhen, wenn die Standard-Lysemethode nicht ausreicht.

- a. 600 µl bis 1 ml der verdünnten Stuhlprobe in ein 2-ml-Röhrchen mit Beads geben und das Röhrchen verschließen.
- b. Die Röhrchen auf einen Plattenvortexer oder ein gleichwertiges Gerät stellen und 10 Minuten lang bei maximaler Geschwindigkeit vortexen oder perlen.
- c. Die Röhrchen in einer Mikrozentrifuge 1 Minute lang bei voller Geschwindigkeit zentrifugieren, um die Perlen von der Probe zu trennen.
6. 300 µl Stuhllysats in ein neues 1,5-ml-Röhrchen geben.
7. 300 µl Lyse-Pufferlösung zugeben und 10 Sekunden lang mit dem Vortex mischen.
8. 30 µl Proteinase-K-Lösung zugeben und kurz vortexen, um zu mischen.
9. 20 Minuten lang bei 56 °C inkubieren.
10. Mit der Vorbereitung der Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge fortfahren (Abschnitt 6.E).

6.B. Vorbereitung von BAL- oder Sputum-Proben zur Verwendung mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

1. Falls eingefroren, BAL- oder Sputum-Probe bei Raumtemperatur auftauen.
Hinweis: Zur Senkung der Viskosität von BAL- und Sputumproben können diese mit dem gleichen Volumen 1X PBS verdünnt, mechanisch homogenisiert oder verdünnt und vor der Verarbeitung homogenisiert werden.
2. Für jede Probe 100–300 µl in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen geben. (Wir empfehlen die Verwendung einer Pipette mit großem Durchmesser). Verwenden Sie bei jeder Probe frische Pipettenspitzen, um eine Kontamination von Probe zu Probe zu verhindern.
3. 12 µl 1-Thioglycerin hinzufügen und zum Mischen pipettieren.
Hinweis: Langsam pipettieren, da die Lösung zähflüssig ist.
4. 300 µl Lyse-Pufferlösung hinzufügen und 10 Sekunden lang mit dem Vortex mischen.
5. 5 Minuten lang bei 95 °C inkubieren. 2 Minuten lang auf der Arbeitsfläche abkühlen lassen.
6. 30 µl Proteinase-K-Lösung zugeben und kurz vortexen, um zu mischen.
7. 20 Minuten lang bei 56 °C inkubieren.
8. Mit der Vorbereitung der Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge fortfahren (Abschnitt 6.E).

6.C. Vorbereitung von Urinproben zur Verwendung mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Vorbereitung geringer Probenmengen (300 µl Urin):

1. Die Urinprobe kurz vortexen, um abgesetzte Zellen zu resuspendieren.
2. Für jede Probe werden 300 µl Urin in ein 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Verwenden Sie bei jeder Probe frische Pipettenspitzen, um eine Kontamination von Probe zu Probe zu verhindern.
3. 300 µl Lyse-Pufferlösung hinzufügen und 10 Sekunden lang mit dem Vortex mischen.
4. 30 µl Proteinase-K-Lösung zugeben und kurz vortexen, um zu mischen.
5. 20 Minuten lang bei 56 °C inkubieren.
6. Mit der Vorbereitung der Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge fortfahren (Abschnitt 6.E).

Vorbereitung großer Probenmengen (30 ml Urin):

1. Die Urinprobe kurz vortexen, um abgesetzte Zellen zu resuspendieren.
2. Für jede Probe 30 ml Urin in ein 50-ml-Röhrchen geben. Verwenden Sie bei jeder Probe frische Pipettenspitzen, um eine Kontamination von Probe zu Probe zu verhindern.
3. Die Urinprobe 10 Minuten lang bei 2.000 × g zentrifugieren.
4. Überstand mit einer Pipette entfernen. Dabei darauf achten, dass das Pellet nicht gestört wird.
Hinweis: Zur Erhaltung der Integrität des Pellets kann etwas Flüssigkeit zurückbleiben (bis zu 300 µl).
5. 300 µl Lyse-Pufferlösung in das Röhrchen geben und das Pellet durch Pipettieren resuspendieren.
6. Das Lysat in ein 1,5-ml-Röhrchen geben.
7. 30 µl Proteinase-K-Lösung zugeben und kurz vortexen, um zu mischen.
8. 20 Minuten lang bei 56 °C inkubieren.
9. Mit der Vorbereitung der Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge fortfahren (Abschnitt 6.E).

6.D. Vorbereitung von Plasma-, Virustransportmedien- oder Pap-Medien-Proben zur Verwendung mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

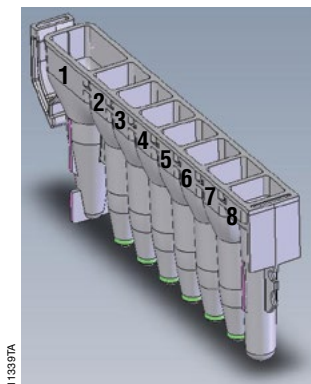
1. Gefrorenes Plasma oder Medium bei Raumtemperatur auftauen und zum Mischen kurz vortexen.
2. Für jede Probe 300 µl des Plasmas oder des Mediums, das die biologische Probe enthält, in ein 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen geben. Verwenden Sie bei jeder Probe frische Pipettenspitzen, um eine Kontamination von Probe zu Probe zu verhindern.
3. 300 µl Lyse-Pufferlösung hinzufügen und 10 Sekunden lang mit dem Vortex mischen.
4. 30 µl Proteinase-K-Lösung zugeben und kurz vortexen, um zu mischen.
5. 20 Minuten lang bei 56 °C inkubieren.
6. Mit der Vorbereitung der Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge fortfahren (Abschnitt 6.E).

6.E. Vorbereiten der Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge

1. Wechseln Sie die Handschuhe, bevor Sie Kartuschen, Stößel und Elutions-Gefäße (0,5 ml) handhaben. Platzieren Sie alle zu verwendenden Kartuschen in der Kartuschenhalterung(en), wobei sich Kammer 1 (die größte Kammer in der Kartusche) auf der gegenüberliegenden Seite zu den Elutions-Gefäßen befindet. Drücken Sie die Kartusche nach unten, bis sie an Ort und Stelle einrastet. Ziehen Sie die Folienversiegelung vorsichtig ab, sodass die gesamte Oberseite der Kartusche frei von Plastik ist. Vergewissern Sie sich, dass sämtliche Dichtklebestreifen und etwaige Kleberückstände entfernt sind, bevor Sie die Kartuschen in der Kartuschenhalterung einsetzen.
2. Platzieren Sie einen Stößel in Kammer 8 jeder Kartusche.
3. Platzieren Sie in allen Kartuschen ein leeres Elutions-Gefäß (0,5 ml) an die hierfür vorgesehene Position in der oder den Kartuschenhalterung(en).
4. Geben Sie unten in jedes Elutions-Gefäß 100 µl der Elutions-Pufferlösung.
5. Schleudern Sie die Proben Lysate kurz in einer Mikrozentrifuge, damit sich die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens sammelt. Übertragen Sie das Probenlysat in Kammer 1 (die größte Kammer) der Kartusche. Geben Sie nichts anderes als das Probenlysat in die Kartusche.
6. Fahren Sie fort mit Abschnitt 7, Einrichtung und Betrieb des Maxwell® Instruments.

Hinweise:

- a. Proben- oder Reagenzienspritzer von der gesamten Kartuschenhalterung sind mit einer Lösung aus Wasser und Reinigungsmittel zu reinigen und anschließend mit einem antibakteriellen Spray einzusprühen bzw. abzuwischen und dann mit Wasser abzuwaschen. Verwenden Sie kein Bleichmittel auf den Instrumententeilen.
- b. Verwenden Sie nur die mitgelieferten 0,5-ml-Elutions-Gefäße aus dem Kit; andere Gefäße sind möglicherweise nicht mit dem Maxwell® Instrument kompatibel.



Vom Benutzer hinzuzugeben

1. Probenlysat
8. CSC/RSC-Stößel

Abbildung 1. Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge. In Kammer 1 wird eine vorverarbeitete Probe gegeben und zu Kammer 8 wird ein Stößel hinzugefügt.



Abbildung 2. Anordnung und Konfiguration der Kartuschenhalterung(en). In die Elutions-Gefäße wird, wie gezeigt, Elutions-Pufferlösung gegeben. Die Stößel befinden sich in Kammer 8 der Kartusche.

7. Einrichtung und Betrieb des Maxwell® Instruments

Ausführliche Informationen hierzu finden Sie im entsprechenden technischen Handbuch zu Ihrem Maxwell® Instrument (siehe Tabelle 1).

1. Schalten Sie das Maxwell® Instrument und den Tablet-PC ein. Melden Sie sich bei Ihrem Tablet-PC an und starten Sie die Maxwell® Software im IVD-Modus durch zweimaliges Antippen des Symbols auf dem Desktop. Das Instrument fährt hoch, führt einen Selbsttest durch und setzt alle beweglichen Teile in ihre Ausgangsstellung zurück.
2. Tippen Sie auf **Start**, um mit der Ausführung einer Methode zu beginnen.
3. Scannen Sie den Methoden-Barcode oben rechts auf dem Etikett des Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit oder geben Sie ihn ein, um die auszuführende Methode automatisch auszuwählen (Abbildung 3).

Hinweis: Der Barcode des Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kits ist für die Aufreinigung mit Maxwell® CSC Instruments erforderlich. Das Etikett des Kits enthält zwei Barcodes. Der Verfahrens-Barcode ist weiter unten in Abbildung 3 zu sehen. Wenn der Barcode nicht gescannt werden kann, wenden Sie sich bitte an Promega Technical Services.



Abbildung 3. Kit-Etikett mit zu scannendem Methoden-Barcode. Der Barcode, der gescannt werden muss, um einen Aufreinigungslauf zu starten, ist in der roten Umrandung oben rechts auf dem Kit-Etikett aufgedruckt.

4. Tippen Sie auf dem Bildschirm „Kartuschen-Einrichtung“ auf die Kartuschenpositionen, um für diesen Extraktionslauf Positionen auszuwählen oder die Auswahl aufzuheben. Geben Sie ggf. erforderliche Probenverfolgungsinformationen ein und tippen Sie auf die Schaltfläche **Fortsetzen**, um fortzufahren.

Hinweis: Bei Verwendung von Maxwell® Instruments mit 48 Positionen müssen Sie die Schaltflächen **Vorderseite** und **Rückseite** drücken, um die Kartuschenpositionen an jeder Kartuschenhalterung festzulegen oder aufzuheben.

5. Überprüfen Sie nach dem Öffnen der Tür, ob alle Elemente der Checkliste Extraktion ausgeführt wurden. Überprüfen Sie, ob die Proben zur Kammer 1 der Kartuschen hinzugegeben wurden, ob die Kartuschen in das Gerät geladen wurden, ob offene Elutions-Gefäße mit Elutions-Pufferlösung vorhanden sind und ob die Stöbel in Kammer 8 gesetzt wurden. Setzen Sie die Kartuschenhalterung(en) mit den vorbereiteten Kartuschen in die Maxwell® Instrumentenplattform ein.

Einsetzen der Maxwell® Kartuschenhalterung: Halten Sie die Kartuschenhalterung an den Seiten fest, damit keine Kartuschen herausfallen. Vergewissern Sie sich, dass die Kartuschenhalterung so in das Maxwell® Instrument eingesetzt wurde, dass sich die Elutions-Gefäße in nächster Nähe zur Tür befinden. Winkeln Sie die Rückseite der Kartuschenhalterung nach unten ab und setzen Sie sie so in das Gerät, dass die Rückseite der Kartuschenhalterung an der Rückseite der Geräteplattform anliegt. Drücken Sie auf die Vorderseite der Kartuschenhalterung, um sie fest in die Geräteplattform einzusetzen. Falls Sie Schwierigkeiten haben, die Kartuschenhalterung in die Plattform zu setzen, überprüfen Sie, ob sie richtig ausgerichtet ist. Stellen Sie sicher, dass die Kartuschenhalterung sich auf der Geräteplattform befindet und vollständig eingesetzt ist.

Hinweis: Sie müssen die Kennung an den Maxwell® Kartuschenhalterungen mit 24 Positionen überprüfen, um festzustellen, ob diese an der Vorder- oder Rückseite des Geräts platziert werden müssen.

6. Überprüfen Sie, ob alle angegebenen Vorverarbeitungsschritte ausgeführt wurden, und tippen Sie auf **Start**, um die Gerätetür zu schließen und die Verarbeitung zu starten.

Hinweis: Bei Verwendung eines Maxwell® Instruments mit 48 Positionen wird die Kartuschenhalterung(en) gescannt, sobald die Tür sich schließt, sofern das Vision System aktiviert wurde. Jegliche Fehler beim Einrichten der Kartuschenhalterung (z. B. Stöbel nicht in Kammer 8, Elutions-Gefäße nicht vorhanden und offen) führen dazu, dass die Software zum Bildschirm „Kartuschen-Einrichtung“ zurückkehrt und die problematischen Positionen mit einem Ausrufezeichen in einem roten Kreis gekennzeichnet werden. Sie können durch Berühren des Ausrufezeichens eine Beschreibung des Fehlers aufrufen und alle Fehlerzustände später beheben. Berühren Sie erneut die Schaltfläche **Start**, um den Scan der Kartuschenhalterung zu wiederholen und mit dem Extraktionslauf zu beginnen.



Warnung: Quetschgefahr.

Das Maxwell® Instrument beginnt sofort mit dem Aufreinigungslauf. Der Bildschirm zeigt u. a. folgende Informationen an: den Benutzer, der den Durchlauf gestartet hat, den aktuell laufenden Methodenschritt und die geschätzte verbleibende Laufzeit.

Hinweise:

- a. Wenn Sie auf die Schaltfläche **Abbruch** tippen, wird der aktuelle Lauf abgebrochen. Alle Proben aus einem abgebrochenen Lauf gehen verloren.
- b. Wird der Lauf vor Beendigung abgebrochen, kann die Aufforderung angezeigt werden, zu prüfen, ob noch Stöbel auf der Stöbelhalterung geladen sind. Wenn Stöbel auf der Stöbelhalterung vorhanden sind, müssen Sie auf Anforderung den Schritt **Reinigung** durchführen. Wenn sich keine Stöbel auf der Stöbelhalterung befinden, können Sie den Schritt **Reinigung** auslassen. Die Proben sind dann nicht mehr zu verwenden. Versuchen Sie nicht, Proben erneut aufzureinigen, wenn ein Gerätelauflauf abgebrochen wurde.

7. Einrichtung und Betrieb des Maxwell® Instruments (Fortsetzung)

7. Befolgen Sie am Ende des Verfahrens die Anweisungen auf dem Bildschirm, um die Tür zu öffnen. Vergewissern Sie sich, dass sich die Stößel am Ende des Laufs in Kammer 8 der Kartusche befinden. Sind noch Stößel an der Stößelhalterung geladen, befolgen Sie die Anweisungen in der entsprechenden Technischen Anleitung zu Ihrem Maxwell® Instrument (Tabelle 1) und führen Sie das Verfahren **Reinigung** durch, um die Stößel zu entladen, sofern möglich.
8. Nehmen Sie die Kartuschenhalterung(en) aus dem Gerät. Entnehmen Sie die Elutions-Gefäße mit der Pathogen-Gesamtnukleinsäure und verschließen Sie sie mit einer Kappe. Falls die Elutions-Gefäße paramagnetische Partikel enthalten, zentrifugieren Sie sie 30 Sekunden bis 1 Minute lang bei 10.000–20.000 × *g* und geben Sie den Überstand in Aufbewahrungsröhrchen (nicht mitgeliefert). Nachdem der Lauf abgeschlossen ist, wird der Extraktionslaufbericht angezeigt. Diesen Bericht können Sie über den Bildschirm „Berichtsansicht“ ausdrucken oder exportieren oder beides.
9. Nehmen Sie die Kartuschen und Stößel aus der oder den Kartuschenhalterung(en) und entsorgen Sie sie entsprechend den Richtlinien Ihres Instituts für gefährliche Abfälle. Die Kartuschen, Stößel und Elutions-Gefäße dürfen nicht wiederverwendet werden.

Hinweis: Stellen Sie sicher, dass alle Proben vor dem Schließen der Tür und dem Beginn der UV-Bestrahlung des Instruments entfernt wurden, um eine Degradierung der Nukleinsäure zu vermeiden.

8. Lagerung eluierter Nukleinsäure

Wenn die Proben nicht unmittelbar verarbeitet werden, lagern Sie die eluierte Pathogen-DNA für maximal 24 Stunden auf Eis oder bei 4 °C. Falls eine längere Lagerung erforderlich ist, frieren Sie die Proben bei –20 °C oder –70 °C ein. Virale RNA ist weniger stabil und sollte bevorzugt sofort nach der Isolierung in nachfolgenden Assays getestet werden. Wenn kurz nach der Isolierung getestet wird, lagern Sie die Pathogen-RNA auf Eis oder bei 4 °C. Alternativ können Sie eluierte Pathogen-RNA bei –70 °C lagern. Spezifische Empfehlungen zur Probenlagerung und -handhabung finden Sie in den Anweisungen für nachgeordnete Anwendungen.

9. Evaluierung der analytischen Leistung

Die Evaluierung der analytischen Leistung des Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit wurde mit verschiedenen Probenotypen vorgenommen, die mit inaktivierten Pathogenen versetzt waren und auf den Maxwell®-CSC- und Maxwell®-CSC-48-Instrumenten verarbeitet wurden.

9.A. Quantität, Qualität und Amplifizierbarkeit der DNA

Die Gesamtnukleinsäure wurde aus 300 µl Replikaten einer Stuhlsuspension extrahiert, die jeweils mit ca. $2,5 \times 10^4$ Kopien inaktivierter *Giardia lamblia* versetzt waren, wobei entweder die Standard- oder die Bead-Beating-Vorbehandlungsmethode angewandt wurde. Die Gesamtnukleinsäure wurde mit 100 µl Elutions-Pufferlösung eluiert. Fünf Mikroliter jedes unverdünnten Eluats wurden in einem qPCR-Assay verwendet, um ein für *G. lamblia* spezifisches DNA-Target zu amplifizieren. Der mit der Standardmethode erzeugte durchschnittliche C_q -Wert betrug 34,39 Zyklen. Der mit der Bead-Beating-Methode erzeugte durchschnittliche C_q -Wert betrug 29,35 Zyklen.



Abbildung 4. Amplifikation der Target-DNA-Sequenz von *G. lamblia* unter Verwendung von Gesamtnukleinsäure, die aus Stuhlproben extrahiert wurde, unter Verwendung der Standard- und der Bead-Beating-Methode.

9.B. RNA-Quantität, -Qualität und -Amplifizierbarkeit

Zur Demonstration, dass die Leistung des Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kits ähnlich ist, wenn es entweder mit dem Maxwell® CSC oder dem Maxwell® CSC 48 Instrument verwendet wird, wurde die Gesamtnukleinsäure unter Verwendung des Kits mit beiden Instrumenten aus acht 300 µl Replikaten von Sputumproben extrahiert, die mit 1×10^4 Kopien des inaktivierten SARS-CoV-2-Virus versetzt waren. Die gesamte Nukleinsäure wurde in 100 µl Elutions-Pufferlösung eluiert. 5 µl jedes Eluats wurden in einem RT-qPCR-Assay verwendet, um eine für SARS-CoV-2 spezifische Target-RNA-Sequenz zu amplifizieren. Der Vergleich der RT-qPCR-Ergebnisse, die aus der mit dem Maxwell® CSC Instrument und dem Maxwell® CSC 48 Instrument extrahierten Gesamtnukleinsäure gewonnen wurden, zeigte, dass alle $|\Delta C_q|$ -Werte $\leq 0,59$ Zyklen waren, mit einem durchschnittlichen $|\Delta C_q|$ von 0,16 Zyklen.

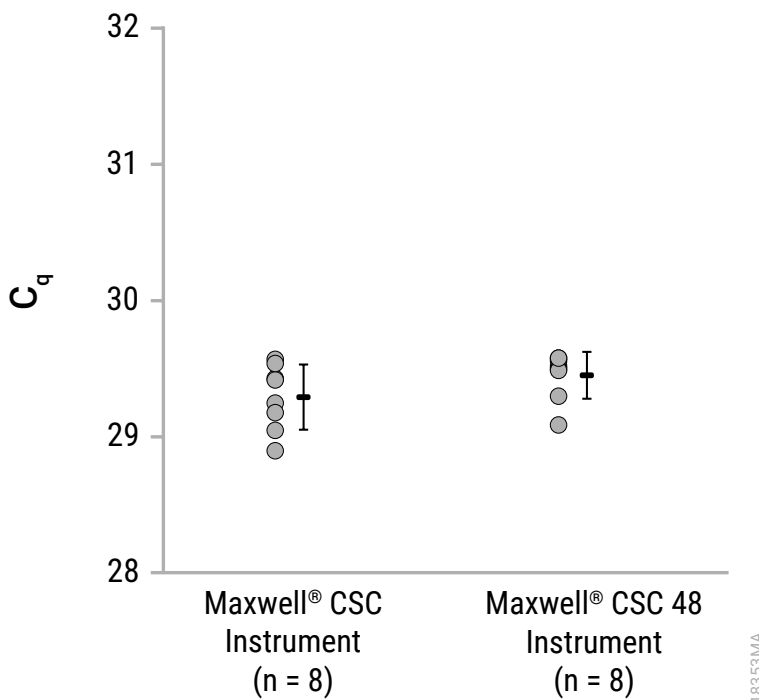


Abbildung 5. Amplifizierbarkeit der gesamten Nukleinsäure, die aus Sputumproben extrahiert wurde, die SARS-CoV-2 enthielten, unter Verwendung des Maxwell® CSC oder Maxwell® CSC 48 Instruments.

Die Gesamtnukleinsäure wurde parallel aus 300 µl und 100 µl bronchoalveolärer Lavage (BAL)-Proben gereinigt, die jeweils mit 1×10^4 Kopien des inaktivierten SARS-CoV-2-Virus versetzt waren, um die Auswirkungen unterschiedlicher Mengen an Probenmatrix auf die Amplifizierbarkeit zu evaluieren. Die gesamte Nukleinsäure wurde in 100 µl Elutions-Pufferlösung eluiert. 5 µl jedes unverdünnten Eluats wurden in einem RT-qPCR-Assay verwendet, um eine für SARS-CoV-2 spezifische Target-RNA-Sequenz zu amplifizieren. Alle C_q -Werte für die aus 300 µl Sputum gereinigte Gesamtnukleinsäure waren $\leq 30,86$ Zyklen, mit einem durchschnittlichen C_q von 30,56 Zyklen. Alle C_q -Werte für die aus 100 µl BAL gereinigte Gesamtnukleinsäure waren $\leq 29,93$ Zyklen, mit einem durchschnittlichen C_q von 29,74 Zyklen.

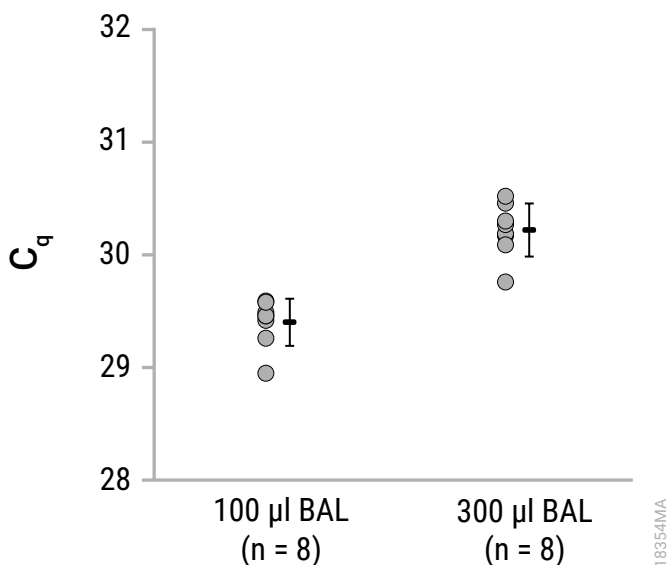


Abbildung 6. Amplifikation der SARS-CoV-2-Target-RNA-Sequenz unter Verwendung von Gesamtnukleinsäure, extrahiert aus verschiedenen Proben-Inputmengen.

9.C. Reproduzierbarkeit

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Gesamtnukleinsäureextraktion mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit zwischen verschiedenen Benutzern wurden von drei Benutzern jeweils fünf 300-µl-Wiederholungen des universellen Transportmediums (UTM), das mit *Bordetella pertussis* versetzt war, vorprozessiert und die Gesamtnukleinsäure im selben Lauf mit dem Maxwell® CSC Instrument extrahiert. Die Nukleinsäuren wurden in 100 µl Elutions-Pufferlösung eluiert. Zur Amplifikation einer für *B. pertussis* spezifischen Target-DNA-Sequenz wurden fünf Mikroliter des unverdünnten Eluats in einem qPCR-Assay verwendet, wobei der durchschnittliche C_q und die Standardabweichung berechnet wurden. Die Aufreinigung der Gesamtnukleinsäure war reproduzierbar, mit Standardabweichungen von 0,31 Zyklen (Benutzer 1), 0,23 Zyklen (Benutzer 2) und 0,40 Zyklen (Benutzer 3). Bei allen drei Benutzern lag die Standardabweichung bei 0,32 Zyklen.

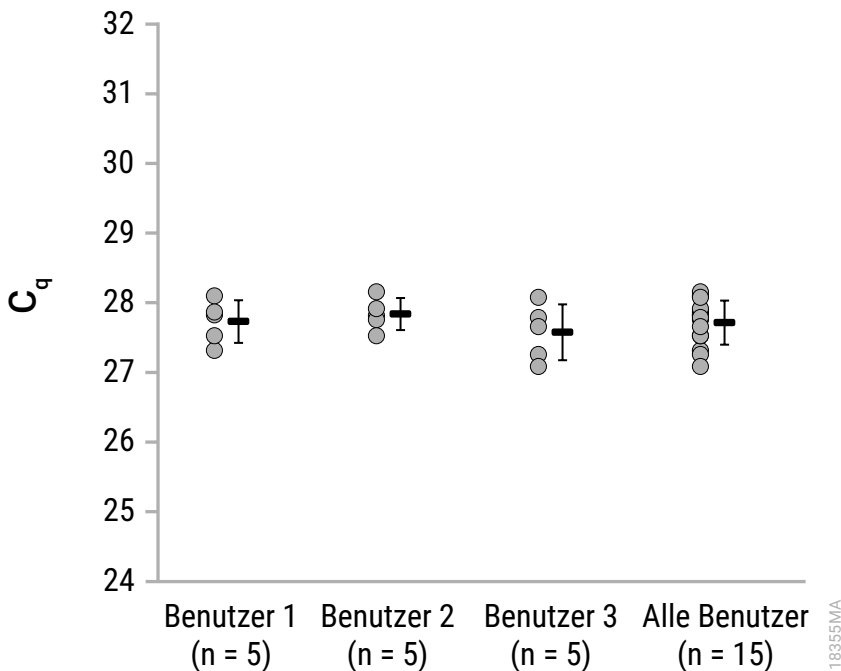


Abbildung 7. Reproduzierbarkeit der Gesamtnukleinsäureextraktion zwischen drei Benutzern.

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit der Gesamtnukleinsäureextraktion zwischen verschiedenen Extraktionsläufen führte ein einzelner Benutzer mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit und den Maxwell® CSC Instrumenten drei verschiedene Gesamtnukleinsäureextraktionsläufe mit jeweils acht 300-µl-Wiederholungen von mit *B. pertussis* versetztem UTM durch. Die Gesamtnukleinsäure wurde bei jedem der drei separaten Läufe in 100 µl Elutions-Pufferlösung eluiert. Zur Amplifikation einer *B. pertussis*-spezifischen Target-DNA-Sequenz wurden fünf Mikroliter des unverdünnten Eluats in einem qPCR-Assay verwendet, wobei der durchschnittliche C_q und die Standardabweichung berechnet wurden. Die Aufreinigung der Gesamtnukleinsäure war reproduzierbar, mit Standardabweichungen von 0,25 Zyklen (Lauf 1), 0,40 Zyklen (Lauf 2) und 0,22 Zyklen (Lauf 3). Bei allen drei Läufen lag die Standardabweichung bei 0,43 Zyklen.

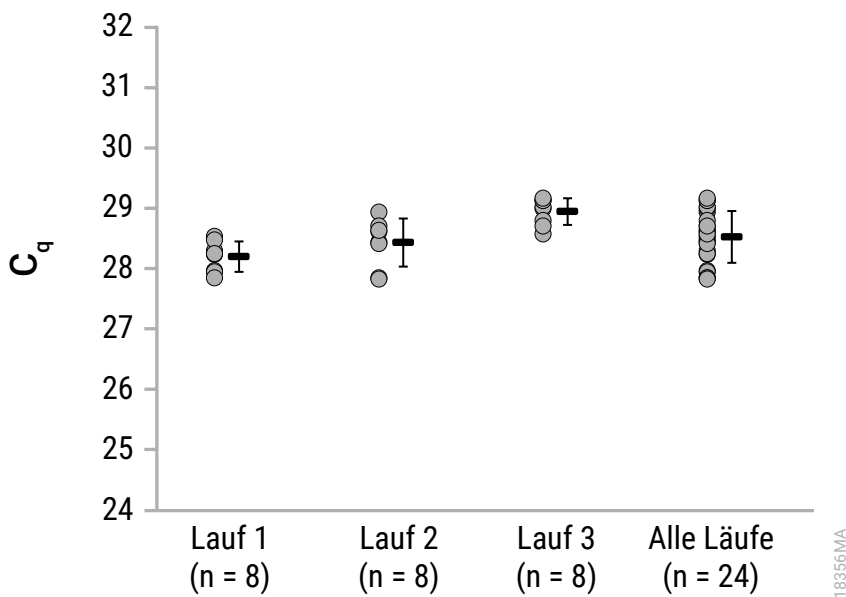


Abbildung 8. Reproduzierbarkeit der Gesamtnukleusextraktion zwischen drei Extraktionsläufen, die von einem einzigen Benutzer durchgeführt wurden.

9.C. Reproduzierbarkeit (Fortsetzung)

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit der Gesamtnukleinsäureextraktion zwischen verschiedenen Chargen des Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit wurde die Gesamtnukleinsäure aus 300-µl-Wiederholungen von mit *B. pertussis* versetztem UTM unter Verwendung von drei Chargen von Kits gereinigt, die jeweils eine einzige Charge kritischer Reagenzien enthalten. Zur Amplifikation einer für *B. pertussis* spezifischen Target-DNA-Sequenz wurde jedes unverdünnte Eluat in einem qPCR-Assay verwendet, wobei der durchschnittliche C_q und die Standardabweichung berechnet wurden. Die Standardabweichung für die C_q -Werte, die mit Charge 1 erzeugt wurden, betrug 0,38 Zyklen, für Charge 2 0,30 Zyklen und für Charge 3 0,35 Zyklen. Die Standardabweichung des C_q -Wertes über alle drei Chargen hinweg betrug 0,34 Zyklen.

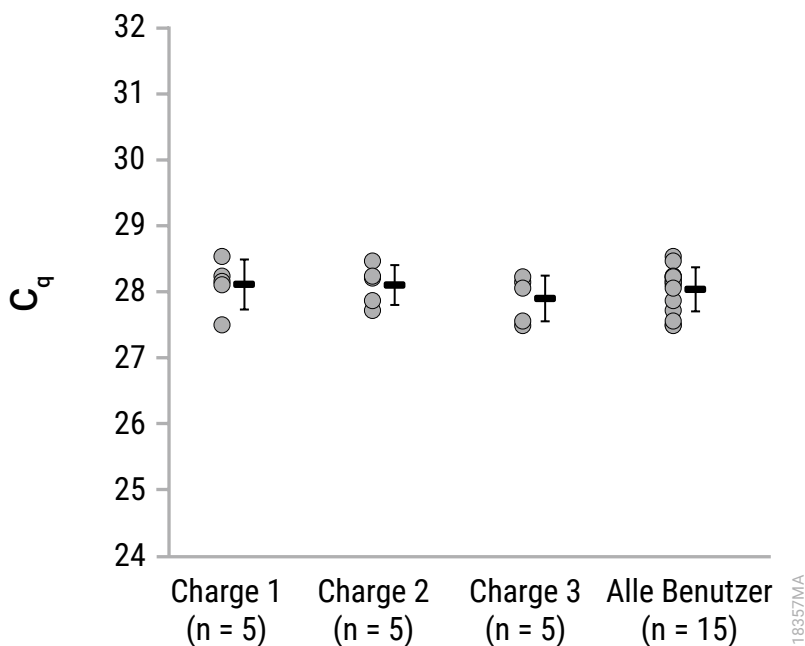


Abbildung 9. Reproduzierbarkeit der Gesamtnukleinsäureextraktion über drei verschiedene Chargen des Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kits.

9.D. Amplifikationshemmung durch Störsubstanzen

Zur Bewertung einer eventuellen Hemmung der Amplifikation durch Störsubstanzen, die mit der Nukleinsäure copurifizieren, wurde die Gesamtnukleinsäure aus acht 300- μ l-Wiederholungen einer Stuhlsuspension gereinigt, die mit 3×10^4 Zellen von inaktiviertem *Clostridium difficile* versetzt war. Fünf Mikroliter jedes unverdünnten Gesamtnukleinsäure-Eluats und 5 μ l einer zehnfachen Verdünnung jedes Eluats wurden in einem qPCR-Assay zur Amplifikation eines für *C. difficile* spezifischen DNA-Targets verwendet, um die Wirkung von Störsubstanzen zu evaluieren. Beim Maxwell® CSC Instrument lagen alle C_q -Werte für die unverdünnten Eluate bei $\leq 27,57$ Zyklen, mit einem durchschnittlichen C_q von 26,93 Zyklen. Beim Maxwell® CSC 48 Instrument lagen alle C_q -Werte für die unverdünnten Eluate bei $\leq 27,24$ Zyklen, mit einem durchschnittlichen C_q von 27,03 Zyklen. C_q -Werte unverdünnter und zehnfach verdünnter Eluate wurden verglichen, um die Bewertung der Hemmung in einzelnen Eluaten zu ermitteln, wobei ein erwartetes ΔC_q von $>2,5$ Zyklen auf keine Hemmung hinweist. Das ΔC_q der unverdünnten und zehnfach verdünnten Eluate für die einzelnen Proben lagen zwischen 3,24 und 3,59, was darauf hindeutet, dass im Eluat vorhandene Störsubstanzen eine minimale Hemmung verursachen.

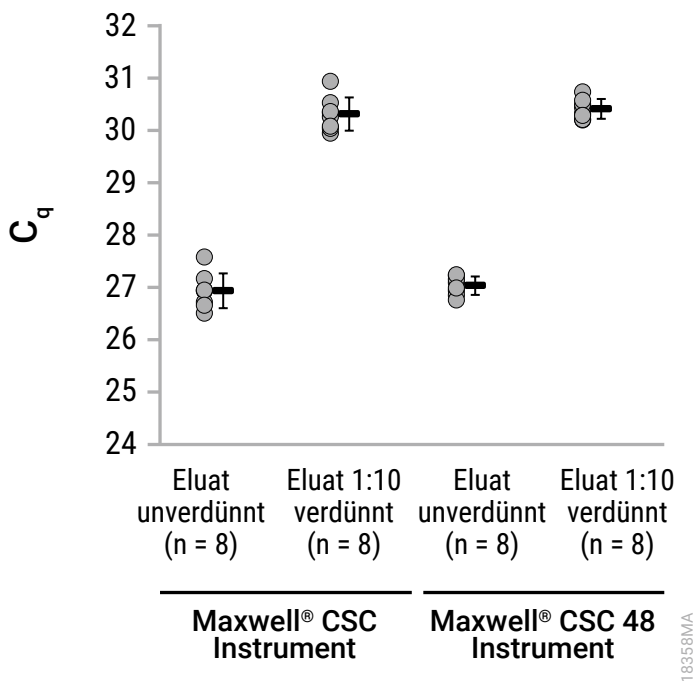


Abbildung 10. Bewertung der Amplifikationshemmung von Gesamtnukleinsäure, extrahiert mit dem Maxwell® CSC oder dem Maxwell® CSC 48 Instrument.

9.D. Amplifikationshemmung durch Störsubstanzen (Fortsetzung)

Die Gesamtnukleinsäure wurde aus acht 300-µl-Wiederholungen von entweder Sputum- oder BAL-Proben extrahiert, die mit 9×10^4 Kopien von inaktivierten *Chlamydia pneumoniae* versetzt waren, und in 100 µl Elutions-Pufferlösung eluiert. Fünf Mikroliter jedes unverdünnten Gesamtnukleinsäure-Eluats und 5 µl einer zehnfachen Verdünnung jedes Eluats wurden in einem qPCR-Assay zur Amplifikation eines für *C. pneumoniae* spezifischen DNA-Targets verwendet, um die Wirkung von Störsubstanzen zu evaluieren. Alle C_q -Werte für die unverdünnten Gesamtnukleinsäure-Eluate aus Sputum waren $\leq 26,59$ Zyklen, mit einem durchschnittlichen C_q von 26,48 Zyklen. Der durchschnittliche C_q -Wert für eine 1:10-Verdünnung der Gesamtnukleinsäure-Eluate aus Sputum betrug 29,83 Zyklen, wobei die Differenz zwischen den durchschnittlichen C_q -Werten für verdünnte und unverdünnte Proben 3,35 Zyklen betrug. Alle C_q -Werte für unverdünnten Eluate aus BAL waren $\leq 26,64$ Zyklen, mit einem durchschnittlichen C_q von 26,41 Zyklen. Der durchschnittliche C_q -Wert für eine 1:10-Verdünnung der Gesamtnukleinsäure-Eluate aus BAL betrug 29,83 Zyklen, wobei die Differenz zwischen den durchschnittlichen C_q -Werten für verdünnte und unverdünnte Proben 3,42 Zyklen betrug, was darauf hindeutet, dass im Eluat vorhandene Störsubstanzen eine minimale Hemmung verursachen.

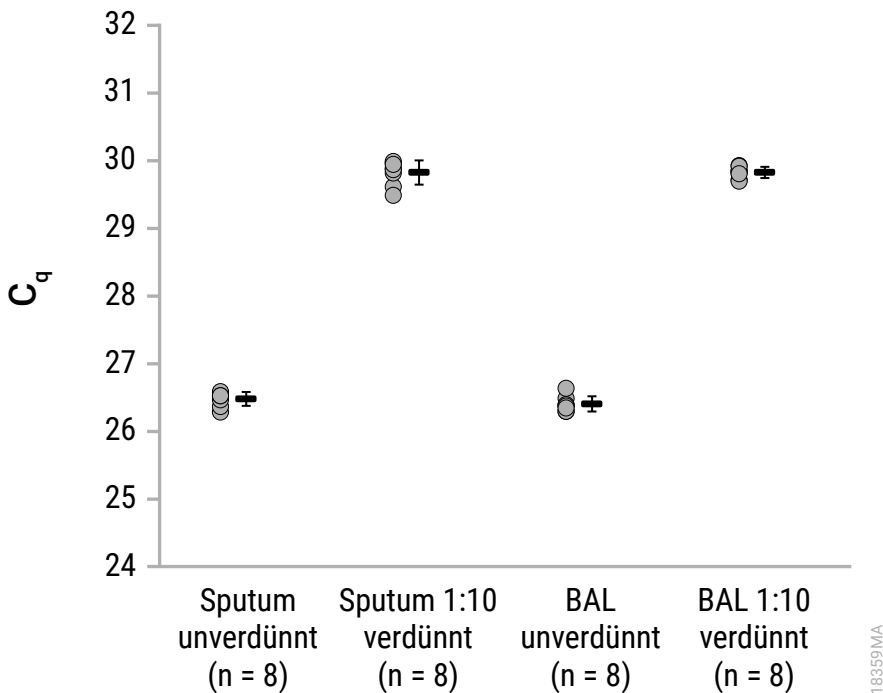


Abbildung 11. Bewertung der Amplifikationshemmung von Gesamtnukleinsäure, extrahiert aus Sputum- und BAL-Proben.

Die Bewertung der Amplifikationshemmung erfolgte durch Extraktion der Gesamtnukleinsäure aus UTM-Proben, die mit inaktiviertem *B. pertussis* versetzt waren, und durch Amplifikation der resultierenden Gesamtnukleinsäure mittels qPCR. Zusammengefasst wurde die Gesamtnukleinsäure aus acht 300- μ l-Replikaten von UTM extrahiert, die mit etwa 1×10^4 Kopien von inaktiviertem *B. pertussis* versetzt waren, und in 100 μ l Elutions-Pufferlösung eluiert. Fünf Mikroliter jedes unverdünnten Gesamtnukleinsäure-Eluats und 5 μ l einer zehnfachen Verdünnung jedes Eluats wurden in einem qPCR-Assay zur Amplifikation eines für *B. pertussis* spezifischen DNA-Targets verwendet, um die Wirkung von Störsubstanzen zu evaluieren. Der durchschnittliche C_q -Wert für unverdünnte Eluate aus UTM-Proben betrug 25,97 Zyklen. Der durchschnittliche C_q -Wert für eine 1:10-Verdünnung der Eluate betrug 29,49 Zyklen, wobei die Differenz zwischen den durchschnittlichen C_q -Werten für verdünnte und unverdünnte Proben 3,52 Zyklen betrug, was darauf hindeutet, dass im Eluat vorhandene Störsubstanzen eine minimale Hemmung verursachen.

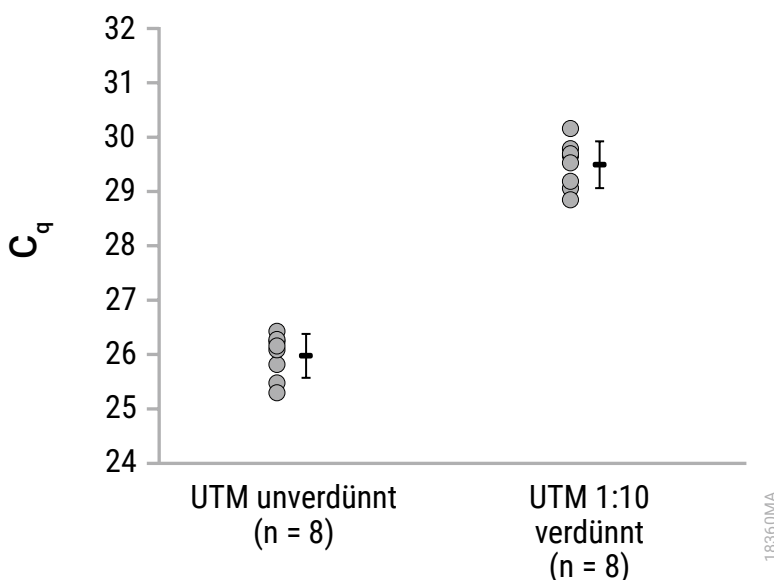


Abbildung 12. Bewertung der Amplifikationshemmung von Gesamtnukleinsäure, extrahiert aus UTM-Proben, die mit *B. pertussis* dotiert sind.

9.D. Amplifikationshemmung durch Störsubstanzen (Fortsetzung)

Die Bewertung der Amplifikationshemmung erfolgte durch Extraktion der Gesamtnukleinsäure aus UTM-Proben, die mit inaktiviertem Herpes simplex Virus 1 (HSV-1) versetzt waren. Die Gesamtnukleinsäure wurde aus acht 300- μ l-Replikaten von UTM extrahiert, die mit etwa 1×10^5 Kopien von inaktiviertem HSV-1 versetzt waren, und in 100 μ l Elutions-Pufferlösung eluiert. Fünf Mikroliter jedes unverdünnten Gesamtnukleinsäure-Eluats und 5 μ l einer zehnfachen Verdünnung jedes Eluats wurden in einem qPCR-Assay zur Amplifikation eines für HSV-1 spezifischen DNA-Targets verwendet, um die Wirkung von Störsubstanzen zu evaluieren. Alle C_q -Werte für unverdünnte Eluate waren $\leq 27,25$ Zyklen, mit einem durchschnittlichen C_q von 26,88 Zyklen. Das ΔC_q der unverdünnten und zehnfach verdünnten Eluate für die einzelnen Proben lagen zwischen 3,44 und 3,91, was darauf hindeutet, dass im Eluat vorhandene Störsubstanzen eine minimale Hemmung verursachen.

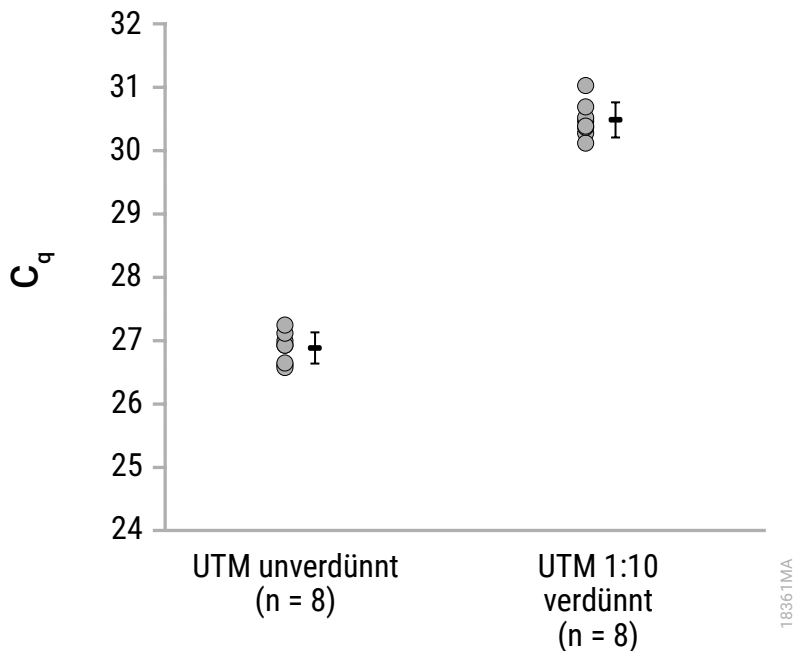


Abbildung 13. Bewertung der Amplifikationshemmung von Gesamtnukleinsäure, extrahiert aus UTM-Proben, die mit HSV-1 dotiert sind.

9.E. Kreuzkontamination

Zur Bewertung der Kreuzkontamination wurde das Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit mit dem Maxwell® CSC Instrument verwendet, indem in einem einzigen Gesamtnukleinsäure-Extraktionslauf abwechselnd Maxwell® CSC Cartridges mit UTM-Proben, die mit inaktiviertem *B. pertussis* dotiert waren, und negative UTM-Proben ohne Zusatz von *B. pertussis* auf der Maxwell® Präsentation eingesetzt wurden. Eluate von *B. pertussis*-positiven und -negativen UTM-Proben wurden in einem qPCR-Assay zur Amplifikation eines für *B. pertussis* spezifischen DNA-Targets verwendet. Die resultierenden C_q-Werte wurden mit einer Standardkurve (10¹–10⁶ Kopien) verglichen, die mit seriellen Verdünnungen einer synthetischen DNA mit der *B. pertussis*-Target-Sequenz gewonnen wurde. Alle UTM-Eluate mit zugesetztem *B. pertussis* hatten C_q-Werte innerhalb der Standardkurve und einen durchschnittlichen C_q-Wert von 25,42 Zyklen. Alle negativen UTM-Eluate ohne Zusatz von *B. pertussis* wiesen C_q-Werte auf, die höher waren als der C_q-Wert, der für die niedrigste DNA-Konzentration der Standardkurve (10 Kopien) ermittelt wurde.

10. Evaluierung der klinischen Leistung

Die klinische Evaluation des Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kits wurde von einem externen klinischen Labor unter Verwendung des Maxwell® CSC 48 Instruments zur Extraktion pathogener Nukleinsäure aus den unten angegebenen klinischen Probenotypen und zur Amplifikation der Nukleinsäure in einem klinisch relevanten Assay durchgeführt.

Tabelle 2. *Clostridium difficile* Gesamtnukleinsäure-Extraktion aus Stuhlproben. Die Gesamtnukleinsäure wurde von einem Tester mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit aus je 200 mg von zehn *Clostridium difficile* (*C. difficile*)-positiven und zehn *C. difficile*-negativen humanen Stuhlproben extrahiert. Die Nukleinsäure wurde auch aus diesen Proben aufgereinigt, wobei die Standardaufreinigungsmethode des Labors als Referenz verwendet wurde. Die resultierenden Eluate wurden durch Amplifikation der *C. difficile*-Toxin-A- und Toxin-B-DNA-Targets in einem qPCR-Assay analysiert. Die mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit aus allen mutmaßlich *C. difficile*-negativen und *C. difficile*-positiven Proben extrahierte Nukleinsäure lieferte das erwartete Ergebnis und zeigte eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die mit Nukleinsäure erzielt wurden, die mit der Labor-Referenz-Extraktionsmethode extrahiert wurde.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Labor-Referenzmethode
Proben mit <i>C. difficile</i> -negativem Status	10/10	10/10
Proben mit <i>C. difficile</i> -positivem Status	10/10	10/10

10. Evaluierung der klinischen Leistung (Fortsetzung)

Tabelle 3. Extraktion der Gesamtnukleinsäure des Cytomegalovirus aus Proben bronchoalveolärer Lavage (BAL).

Die Gesamtnukleinsäure wurde von einem Tester mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit aus zehn Cytomegalovirus (CMV)-positiven (100 µl und 300 µl) und zehn CMV-negativen (300 µl) humanen BAL-Proben extrahiert. Darüber hinaus wurde die Gesamtnukleinsäure aus 300 µl derselben zehn CMV-positiven und zehn CMV-negativen BAL-Proben extrahiert, wobei als Referenz die Standard-Aufreinigungsmethode des Labors verwendet wurde. Die resultierenden Eluate wurden durch Amplifikation des CMV-major-immediate-early-gene-DNA-Targets in einem qPCR-Assay analysiert. Die mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit aufgereinigte Nukleinsäure aus allen mutmaßlich CMV-negativen und CMV-positiven Proben (sowohl 100 µl als auch 300 µl) lieferte das erwartete Ergebnis und zeigte eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die mit Nukleinsäure erzielt wurden, die mit der Labor-Referenz-Extraktionsmethode extrahiert wurde.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Labor-Referenzmethode
Proben mit CMV-negativem Status	10/10 für 300 µl Input-Volumen	10/10 für 300 µl Input-Volumen
Proben mit CMV-positivem Status	10/10 für 100 µl Input-Volumen 10/10 für 300 µl Input-Volumen	10/10 für 300 µl Input-Volumen

Tabelle 4. SARS-CoV-2-Gesamtnukleinsäureextraktion aus Virustransportmedium (VTM)-Proben. Zwei Tester extrahierten Gesamtnukleinsäure aus 300 µl VTM, die eine Nasopharyngealabstrichprobe enthielten. Die Gesamtnukleinsäure wurde von zwei Testern mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit aus zehn SARS-CoV-2-positiven und zehn SARS-CoV-2-negativen humanen VTM-Proben extrahiert. Ein Tester extrahierte auch Nukleinsäure aus denselben Proben, wobei die Standard-Aufreinigungsmethode des Labors als Referenz verwendet wurde. Die resultierenden Eluate wurden durch Amplifikation der SARS-CoV-2-RdRP- und N-Genen in einem RT-qPCR-Assay analysiert. Die mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit aus allen SARS-CoV-2-negativen und SARS-CoV-2-positiven Proben extrahierte Nukleinsäure lieferte das erwartete Ergebnis und wies eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen auf, die mit Nukleinsäure erzielt wurden, die mit der Labor-Referenz-Extraktionsmethode extrahiert wurde.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Labor-Referenzmethode
Proben mit SARS-CoV-2-negativem Status	10/10 für Tester A 10/10 für Tester B	10/10
Proben mit SARS-CoV-2-positivem Status	10/10 für Tester A 10/10 für Tester B	10/10

Tabelle 5. Extraktion der Gesamtnukleinsäure des humanen Papillomavirus aus Pap-Medium-Proben. Ein Tester extrahierte Gesamtnukleinsäure aus 300 µl ThinPrep® PAP-Medium-Proben, die von humanen Patientinnen erfasste Zervixbürstungen enthielten. Die Gesamtnukleinsäure wurde mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit aus neun humanen Papillomavirus (HPV)-positiven und neun HPV-negativen Pap-Medium-Proben extrahiert. Aus denselben Proben wurde auch Nukleinsäure extrahiert, wobei die Standardaufreinigungsmethode des Labors als Referenz verwendet wurde. Die resultierenden Eluate wurden durch Amplifikation der HPV-16-, HPV-18- und Hochrisiko-HPV-DNA-Targets in einem qPCR-Assay analysiert. Die mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit aus allen HPV-positiven Pap-Medium-Proben extrahierte Nukleinsäure lieferte das erwartete Ergebnis und zeigte eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die mit Nukleinsäure erzielt wurden, die mit der Labor-Referenz-Extraktionsmethode extrahiert wurde.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Labor-Referenzmethode
Proben mit HPV-negativem Status	9/9	9/9
Proben mit HPV-positivem Status	9/9	9/9

Tabelle 6. Extraktion der Gesamtnukleinsäure des Cytomegalovirus aus Urinproben. Die Gesamtnukleinsäure wurde von einem Tester mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit aus je 300 µl von zehn CMV-positiven und zehn CMV-negativen menschlichen Urinproben extrahiert. Aus denselben Proben wurde auch Nukleinsäure extrahiert, wobei die Standardaufreinigungsmethode des Labors als Referenz verwendet wurde. Die resultierenden Eluate wurden durch Amplifikation des CMV-major-immediate-early-gene-DNA-Targets in einem qPCR-Assay analysiert. Alle CMV-negativen und neun der zehn CMV-positiven Humanurinproben wiesen eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen auf, die mit der Nukleinsäureextraktion nach der Labor-Referenzextraktionsmethode erzielt wurden. Eine mutmaßlich CMV-positive Urinprobe wies eine Unstimmigkeit zwischen den beiden Aufreinigungsverfahren auf, mit einem negativen Ergebnis für das Maxwell® CSC-Aufreinigungssystem und einem schwach positiven Ergebnis (niedrigster C_q-Wert von 36,26 bei vier Replikaten mit positivem Ergebnis von insgesamt fünf getesteten Replikaten) unter Verwendung der Labor-Referenzmethode.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Labor-Referenzmethode
Proben mit CMV-negativem Status	10/10	10/10
Proben mit CMV-positivem Status	9/10	10/10

10. Evaluierung der klinischen Leistung (Fortsetzung)

Tabelle 7. Extraktion der Gesamtnukleinsäure des Cytomegalovirus aus Plasma. Die Gesamtnukleinsäure wurde von einem Tester mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit aus je 300 µl von zehn CMV-positiven und zehn CMV-negativen menschlichen Plasma extrahiert. Aus denselben Proben wurde auch Nukleinsäure extrahiert, wobei die Standardaufreinigungsmethode des Labors als Referenz verwendet wurde. Die resultierenden Eluate wurden durch Amplifikation des CMV-major-immediate-early-gene-DNA-Targets in einem qPCR-Assay analysiert. Die mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit aus allen CMV-negativen und CMV-positiven humanen Plasmaproben extrahierte Nukleinsäure lieferte das erwartete Ergebnis und zeigte eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die mit Nukleinsäure erzielt wurden, die mit der Labor-Referenz-Extraktionsmethode extrahiert wurde.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Labor-Referenzmethode
Proben mit CMV-negativem Status	10/10	10/10
Proben mit CMV-positivem Status	10/10	10/10

Die Bewertung von Kreuzkontaminationen, die in der vorgesehenen Umgebung des Benutzers unter Verwendung des Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit auftreten, erfolgte durch den Wechsel der Maxwell® CSC Cartridges mit CMV-positiven und CMV-negativen humanen Plasmaproben auf dem Maxwell® CSC 48-Instrumentendeck in einem einzigen Gesamtnukleinsäure-Extraktionslauf. Es wurde keine Kreuzkontamination beobachtet, da die negativen Proben in einem qPCR-Assay für ein CMV-DNA-Target ein negatives Ergebnis lieferten.

11. Erstellen einer ribonukleasefreien Umgebung

Ribonukleasen sind extrem schwer zu inaktivieren. Achten Sie darauf, dass während und nach der Isolierung keine RNase-Aktivität in die Gesamtnukleinsäure-Proben gelangt, die RNA enthalten. Dies ist besonders wichtig, wenn es schwierig war, an das Ausgangsmaterial zu gelangen oder wenn das Ausgangsmaterial unersetzlich ist. Die folgenden Hinweise sollen Ihnen dabei helfen zu verhindern, dass Ihre Proben versehentlich mit RNase kontaminiert werden.

1. Zwei der häufigsten Ursachen für eine RNase-Kontaminierung sind die Hände des Benutzers sowie Bakterien oder Schimmel, die in durch die Luft übertragenen Staubpartikeln vorkommen. Um zu verhindern, dass es aufgrund dieser Ursachen zu Kontaminationen kommt, wenden Sie bei der Handhabung der im Lieferumfang dieses Systems enthaltenen Reagenzien sterile Verfahren an. Tragen Sie immer Handschuhe. Wechseln Sie die Handschuhe, sobald Sie in Kontakt mit Ribonukleasen gekommen sind.
2. Sofern möglich, sollten für die Handhabung von Gesamtnukleinsäure, die RNA enthält, sterile Einweg-Kunststoffprodukte verwendet werden. Diese Materialien sind in der Regel RNase-frei und müssen nicht vorbehandelt werden, um die RNase zu inaktivieren.
3. Behandeln Sie unsterile Glas- und Kunststoffprodukte und Elektrophoresekammern, bevor Sie sie verwenden, um sicherzustellen, dass sie RNase-frei sind. Stellen Sie Glasprodukte über Nacht bei 200 °C in den Ofen und spülen Sie Kunststoffprodukte sorgfältig mit 0,1 N NaOH, 1 mM EDTA und anschließend mit RNase-freiem Wasser ab. Sie können auch im Handel erhältliche Produkte zur Entfernung der RNase verwenden, wenn Sie dabei die Herstelleranweisungen beachten.

Hinweis: Elektrophoresekammern können von der Analyse von DNA-Proben mit Ribonukleasen, insbesondere mit RNase A, kontaminiert sein. Sofern möglich, verwenden Sie für RNA-Analysen ausschließlich neue oder dekontaminierte Apparate.

4. Behandeln Sie Lösungen, die nicht im Lieferumfang des Systems enthalten sind, indem Sie 0,1 % v/v Diethylpyrocarbonat (DEPC) in einem Abzug hinzugeben. Über Nacht inkubieren und dabei bei Raumtemperatur in dem Abzug umrühren. 30 Minuten autoklavieren, um etwaige DEPC-Rückstände zu entfernen.



Achtung: DEPC ist ein mutmaßliches Karzinogen und sollte daher nur in einem Laborabzug verwendet werden. DEPC reagiert schnell mit Aminen und kann nicht für die Tris-Puffer-Behandlung eingesetzt werden.

Hinweis: Bei allen nachfolgenden Anwendungen ist es unerlässlich, dass Sie Ihre RNA-Proben weiterhin vor RNasen schützen. Tragen Sie saubere Handschuhe und verwenden Sie RNase-freie Lösungen und Zentrifugengefäße.

12. Literaturhinweise

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

13. Fehlerbehebung

Bei Fragen, die hier nicht angesprochen werden, wenden Sie sich bitte an Ihre Promega-Niederlassung oder Ihren Vertriebspartner vor Ort. Die Kontaktdaten finden Sie unter: **www.promega.com**. E-Mail: **techserv@promega.com**

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Gewinn der pathogenen Nukleinsäure geringer als erwartet (z. B. bei internen Kontrollen, die vom Kunden selbst bereitgestellt werden)	Die Ausgangsproben waren beeinträchtigt. Stellen Sie sicher, dass die Proben gemäß den empfohlenen Richtlinien entnommen, versandt und gelagert wurden. Stellen Sie bei Proben mit viraler RNA sicher, dass bei der Probenvorbereitung und Assay-Einrichtung RNase-freie Bedingungen gegeben sind, einschließlich RNase-freier Röhrchen und Pipettenspitzen. Verarbeitungsschritt war nicht optimal. • Verwenden Sie nur die in diesem Kit enthaltene Lyse-Pufferlösung. • Ein unzureichendes Mischen kann die Lyse beeinträchtigen. Vortexen Sie die Probe mit der Lyselösung gemäß den Empfehlungen. • Unvollständige Proteasebehandlung zur Entfernung von viralen Kapsiden und/oder Proteinen aus Bakterien und Parasiten. Prüfen Sie die Temperatur des Heizblocks oder Wasserbads und inkubieren Sie für die gesamte empfohlene Zeit. • Bei der Arbeit mit schwer lysierbaren Pathogenen (grampositive Bakterien oder Parasiten) im Stuhl kann der optionale Bead-Beating-Schritt angewendet werden. • Stellen Sie sicher, dass 1-Thioglycerin für die Vorbehandlung der BAL- oder Sputum-Proben zugesetzt wurde. Das Weglassen von 1-Thioglycerin kann sich negativ auf die Ergiebigkeit auswirken. • Das Hinzufügen von mehr Proben als empfohlen kann die Nukleinsäuregewinnung beeinträchtigen. Überprüfen Sie, ob der Kartusche ein Stößel hinzugefügt wurde. Lagerungsprobleme nach der Aufreinigung. • Entnehmen Sie die Eluate nach dem Durchlauf aus dem Maxwell® Instrument und lagern Sie sie bei der empfohlenen Temperatur. • Setzen Sie Eluate vor nachfolgenden Assays keinen mehrfachen Gefrier-Auftau-Zyklen aus. Interne Nukleinsäure-Kontrollen, die kleiner als 100 bp sind, werden mit dem System möglicherweise unzureichend aufgereinigt. Der Benutzer hat für eine zureichende Leistung interner Kontrollen zu sorgen.

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Schlechte Amplifikation	Ein Übertrag paramagnetischer Partikel kann Interferenzen bei den Amplifikationsreaktionen verursachen. Entfernen Sie die Partikel im Elutions-Gefäß durch Zentrifugation oder magnetische Trennung. Der falsche Elutions-Puffer wurde hinzugefügt. Verwenden Sie ausschließlich die Elutions-Pufferlösung, die mit dem Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit geliefert wurde.
Kreuzkontamination	Verwenden Sie bei jeder Probe frische Pipettenspitzen, um eine Kontamination von Probe zu Probe zu verhindern. Vermeiden Sie Spritzer beim Hinzufügen von Lysat zu Kartuschen. Um eine Kontamination benachbarter Kartuschen zu verhindern, können die Kartuschen zur Hinzugabe von Proben aus der Kartuschenhalterung entfernt werden.
Das Gerät kann die Stößel nicht aufnehmen	Stellen Sie sicher, dass Sie ein Maxwell® CSC-spezifisches Chemie-Kit verwenden; die Stößel für die Maxwell® CSC Reagent Kits sind bei diesen Kits für die unterstützten Maxwell® Instrumente spezifisch.

Jeder schwerwiegende Vorfall in Zusammenhang mit dem Produkt, der zum Tod oder zu schweren Verletzungen eines Benutzers oder Patienten geführt hat oder führen könnte, ist dem Hersteller unverzüglich zu melden. Benutzer mit Sitz in der Europäischen Union sollten alle schwerwiegenden Vorfälle zudem der zuständigen Behörde des Mitgliedsstaat, in dem der Benutzer und/oder der Patient niedergelassen ist, melden.

14. Verwandte Produkte

Geräte und Zubehör

Produkt	Größe	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument	jeweils 1	AS6000
Maxwell® CSC 48 Instrument	jeweils 1	AS8000
Maxwell® RSC/CSC Plungers, 50er Packung	jeweils 1	AS1331
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	jeweils 1	SP6019
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	jeweils 1	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	jeweils 1	AS8402
ClickFit Microtube, 1,5 ml	1.000/Pck.	V4741

Maxwell® CSC Reagent Kits

Eine Liste der verfügbaren Maxwell® CSC Purification Kits finden Sie unter: www.promega.com

^(a)US-Pat. Nr. 7,329,488 und S. Korean Pat. Nr. 100483684.

© 2022 Promega Corporation. Alle Rechte vorbehalten.

Maxwell ist eine Marke der Promega Corporation.

ThinPrep ist eine eingetragene Marke von Hologic, Inc.

Die Produkte können angemeldeten oder erteilten Patenten oder bestimmten Einschränkungen unterliegen. Weitere Informationen finden Sie auf unserer Website. Alle Preise und technischen Daten können ohne vorherige Ankündigung geändert werden.

Änderungen zu Produktansprüchen bleiben vorbehalten. Bitte wenden Sie sich an Promega Technical Services oder rufen Sie den Online-Katalog von Promega auf, um die aktuellsten Informationen zu Promega-Produkten aufzurufen