

MANUEL TECHNIQUE

Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Mode d'emploi du produit
AS1860

Mise en garde : manipulez les cartouches avec précautions ; les bords d'étanchéité peuvent être coupants.



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanovre, Allemagne



MODE D'EMPLOI
DU PRODUIT
AS1860



Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Toute la littérature technique est disponible sur : www.promega.com/protocols/

Consultez le site Internet pour vérifier que vous utilisez bien la version la plus récente de ce manuel technique.

Si vous avez des questions concernant l'utilisation de ce système, envoyez un e-mail à Promega Technical Services : techserv@promega.com

1. Description	2
2. Composants du produit et conditions de stockage.....	3
3. Destination/Usage prévu du produit	5
4. Limites d'utilisation du produit.....	5
5. Avant de commencer.....	6
6. Préparation des échantillons	7
6.A. Préparation des échantillons de selles à utiliser avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	7
6.B. Préparation des échantillons de LBA ou d'expectorations à utiliser avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	8
6.C. Préparation des échantillons d'urine à utiliser avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.....	9
6.D. Préparation d'échantillons de plasma, de milieu de transport viral ou de milieu Pap à utiliser avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	10
6.E. Préparation de la Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge	10
7. Installation et utilisation de l'appareil Maxwell®	12
8. Stockage des acides nucléiques élués	14
9. Évaluation des performances analytiques	15
9.A. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ADN	15
9.B. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ARN	16
9.C. Reproductibilité	18
9.D. Inhibition de l'amplification en raison de substances interférentes	21
9.E. Contamination croisée	25
10. Évaluation des performances cliniques	25
11. Création d'un environnement sans ribonucléase	29
12. Références	29
13. Dépannage	30
14. Produits apparentés	31

Le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit n'est disponible que dans certains pays.

1. Description

Le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit^(a) est utilisé avec les appareils Maxwell® spécifiés au Tableau 1 afin d'offrir une méthode facile, automatique et efficace de préparation d'échantillons et de purification des acides nucléiques totaux pathogènes. Les appareils Maxwell® CSC Instrument sont conçus pour être utilisés avec des cartouches de réactifs pré-dispensés et des procédures de purification préprogrammées, pour une simplicité et une facilité d'emploi maximales. Le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit a été conçu pour réaliser l'extraction automatique des acides nucléiques totaux bactériens, viraux et parasites issus des échantillons biologiques humains suivants : selles, expectorations, lavage broncho-alvéolaire, urine, plasma, prélèvements nasopharyngés et prélèvements cervicaux dans du milieu de transport. La méthode Maxwell® Instrument pour le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit peut traiter d'un au nombre maximum d'échantillons Maxwell® Instrument en 40 minutes environ. Le faible volume d'élution de 100 µl produit des acides nucléiques purifiés concentrés pour les applications en aval, telles que le PCR quantitatif (qPCR) ou le RT-PCR quantitatif (RT-qPCR). Après une brève étape de prétraitement de lyse, l'échantillon est ajouté à la Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge et le reste du traitement est entièrement automatique.

Tableau 1. Appareils pris en charge.

Appareil	Cat.#	Manuel technique
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

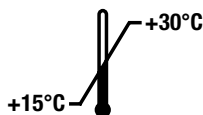
Principe de la méthode

Le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit purifie les échantillons à l'aide de particules paramagnétiques, qui fournissent une phase solide mobile pour optimiser le prélèvement d'échantillons, le lavage et la purification des acides nucléiques. Les appareils Maxwell® sont des appareils magnétiques de traitement des particules qui permettent la fixation efficace des acides nucléiques aux particules paramagnétiques dans le premier puits d'une cartouche préremplie. Les échantillons sont traités par une série de lavages avant l'élution des acides nucléiques totaux.

2. Composants du produit et conditions de stockage

PRODUIT	TAILLE	CAT.#
Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit	48 préparations	AS1860

Pour diagnostic in vitro. Usage professionnel uniquement. Suffisant pour 48 isolements. Les cartouches sont à usage unique.



Inclut :

- 150 ml Tampon de dilution (ST1)
- 900 µl 1-Thioglycérol
- 20 ml Tampon de lyse
- 2 × 1 ml Solution de protéinase K (PK)
- 50 Plongeurs CSC/RSC
- 48 Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ)
- 50 Tubes d'élution (0,5 ml)
- 20 ml Tampon d'élution

Conditions de stockage : dès réception, retirez le 1-Thioglycérol et stockez-le entre +2 °C et +10 °C. Stockez les autres composants du kit à température ambiante (+15 °C à +30 °C).



Informations relatives à la sécurité : les cartouches contiennent de l'éthanol, de l'isopropanol et de l'hydrochlorure de guanidine. L'éthanol et l'isopropanol doivent être considérés comme inflammables, nocifs et irritants. L'hydrochlorure de guanidine doit être considéré comme toxique, nocif et irritant. Vous trouverez des informations détaillées relatives à la sécurité dans la SDS.



Les cartouches sont conçues pour être utilisées avec des substances potentiellement infectieuses. Portez une protection appropriée (ex : gants et lunettes) lors de la manipulation de substances infectieuses. Suivez les directives de votre établissement concernant la manipulation et l'élimination de toute substance infectieuse utilisée en conjonction avec ce système.

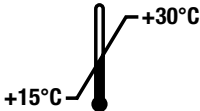


Mise en garde : manipulez les cartouches avec précautions ; les bords peuvent être coupants.

Informations supplémentaires : les composants du Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit sont homologués et ont passé des tests de contrôle qualité pour fonctionner ensemble. Ne mélangez **pas** les composants du kit entre différents lots. Utilisez uniquement les composants fournis dans le kit. N'utilisez pas de cartouches reçues avec un joint endommagé. Pour plus d'informations relatives à la sécurité, voir la fiche de données de sécurité, disponible à l'adresse suivante : www.promega.com

2. Composants du produit et conditions de stockage (suite)

Légende des symboles

Symbole	Explication	Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Ne pas réutiliser
	Stocker à une température comprise entre +15 °C et +30 °C.		Fabricant
	Mise en garde		Inflammable
	Danger pour la santé		Contenu suffisant pour « n » tests
	Avertissement. Risque de pincement.		Avertissement. Risque biologique.
	Numéro de lot		Référence
	Conformité Européenne		Représentant agréé

3. Destination/Usage prévu du produit

Le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit est conçu pour être utilisé, en association avec les Maxwell® CSC Instruments et la méthode Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid, comme dispositif médical de diagnostic in vitro (IVD) pour isoler automatiquement les acides nucléiques totaux viraux, bactériens et/ou parasites des types d'échantillons humains suivants : selles, expectorations, lavage broncho-alvéolaire, prélèvements nasopharyngés dans du milieu de transport, prélèvements cervicaux dans du milieu de transport, urine et plasma. Les acides nucléiques totaux purifiés sont adaptés aux essais de diagnostic in vitro fondés sur l'amplification.

Le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit est destiné à être utilisé à une température comprise entre 15 °C et 30 °C. Toute utilisation en dehors de cette plage de température peut produire des résultats sous-optimaux.

Le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit est destiné à un usage professionnel uniquement. Les résultats de diagnostic obtenus à l'aide des acides nucléiques totaux purifiés avec ce système doivent être interprétés conjointement à d'autres données cliniques ou de laboratoire.

4. Limites d'utilisation du produit

Les performances du Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit ont été évaluées pour les agents pathogènes suivants avec les types d'échantillons indiqués :

- Bactéries : selles, expectorations, lavage broncho-alvéolaire, prélèvements nasopharyngés dans du milieu de transport, prélèvements cervicaux dans du milieu de transport, urine.
- Parasites : selles, prélèvements cervicaux dans du milieu de transport, urine.
- Virus : selles, expectorations, lavage broncho-alvéolaire, prélèvements nasopharyngés dans du milieu de transport, prélèvements cervicaux dans du milieu de transport, urine, plasma.

Le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit n'est pas destiné à être utilisé avec des échantillons non humains.

Des contrôles appropriés doivent être inclus dans toute application diagnostique en aval utilisant les acides nucléiques totaux purifiés avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. L'utilisateur est tenu de valider la performance des acides nucléiques purifiés dans les applications de diagnostic en aval.

5. Avant de commencer

Matériel à fournir par l'utilisateur

- tubes de 1,5–2,0 ml pour l'incubation des échantillons (ex : ClickFit Microtube, 1,5 ml [Cat.# V4741] ; recommandé pour éviter une ouverture du bouchon pendant le chauffage)
- tube conique de 15 ml ou 50 ml pour la préparation de la solution de lyse
- vortex de paillasse
- pipettes et cônes de pipettes pour le transfert d'échantillons dans des cartouches de réactifs préremplies
- bloc chauffant ou bain d'eau réglé à 56 °C
- bloc chauffant réglé à 95 °C pour les expectorations et les échantillons de LBA
- **facultatif** : 1X PBS pour diluer les échantillons de LBA et d'expectorations
- **facultatif** : centrifugeuse pour le prétraitement des échantillons d'urine
- **facultatif** : billes de zirconium de 0,1–0,5 mm pour le prétraitement des échantillons de selles (ex : billes ZR BashingBead, Zymo [Cat. #S6012-50])
- tubes pour échantillons de selles, expectorations, lavage broncho-alvéolaire (LBA), milieu de transport viral (MTV), milieu Pap, plasma et urine



Les précautions applicables aux agents pathogènes transmissibles par le sang sont recommandées lors du traitement de tout prélèvement d'origine humaine.

Pour les échantillons de plasma, prélevez le sang dans des tubes avec anticoagulant EDTA. Évitez l'utilisation de tubes de prélèvement de sang contenant de l'héparine car l'héparine peut inhiber les amplifications en aval.

Les recommandations générales suivantes concernent la préparation et le stockage d'échantillons (depuis les références 1–4) :

1. Séparez le plasma des cellules dans l'heure suivant la prise de sang en centrifugeant à 1 500 × *g* pendant 20 minutes à 25 °C, puis transférez la couche de plasma dans un tube propre. Stockez le plasma à 2–8 °C jusqu'à 24 heures ou, dans un délai de 24 heures, congelez les échantillons qui ne sont pas traités jusqu'à 5 jours à –20 °C.
2. Pour les écouvillons dans du MTV, utilisez uniquement des écouvillons en fibres synthétiques avec des tiges en plastique. N'utilisez pas d'écouvillons en alginate de calcium ni d'écouvillons avec des tiges en bois car ils peuvent contenir des substances qui inhibent les tests PCR. Placez immédiatement les écouvillons dans des tubes stériles contenant 2–3 ml de milieu de transport viral. Stockez le MTV et les échantillons à 2–8 °C jusqu'à 72 heures ou congelez les échantillons à –70 °C. Évitez les cycles de congélation-décongélation répétés et ne stockez pas les échantillons dans un congélateur avec fonction antigivre. Les conditions de prélèvement et de stockage spécifiques peuvent varier en fonction du virus isolé.
3. Stockez les échantillons d'urine frais à 4 °C jusqu'à 24 heures avant leur traitement. Pour un stockage de plus longue durée, ajoutez de l'EDTA à une concentration finale de 20 mM. Pour éviter la lyse des cellules, stockez l'urine stabilisée à 4 °C. Pour éviter la lyse des cellules, l'urine ne devrait pas être congelée. Si l'urine est congelée et décongelée, un précipité peut devenir visible. Le mélange et/ou le chauffage de l'échantillon devrait permettre de resolubiliser le précipité. Évitez de centrifuger l'échantillon pour faire disparaître le précipité car cela peut éliminer les cellules pathogènes intactes.

4. Stockez les échantillons de LBA et d'expectorations à 2–8 °C jusqu'à 72 heures ou congelez les échantillons à –70 °C. Évitez les cycles de congélation-décongélation répétés et ne stockez pas les échantillons dans un congélateur avec fonction antigivre. Les conditions de prélèvement et de stockage spécifiques peuvent varier en fonction de l'agent pathogène isolé.
5. Les échantillons de selles doivent être congelés à –20 °C à –80 °C avant leur traitement.

6. Préparation des échantillons

6.A. Préparation des échantillons de selles à utiliser avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

1. Pesez 100–500 mg d'échantillons de matières fécales dans un tube microcentrifuge avec bouchon à vis de 2 ml.
2. Ajoutez 1 ml de tampon de dilution (ST1) pour remettre l'échantillon en suspension. Vortexez vigoureusement pendant 30 secondes à 1 minute. Utilisez de nouveaux cônes de pipettes pour chaque échantillon afin d'éviter que les échantillons se contaminent entre eux.
3. Centrifugez l'échantillon à 1 000 × g pendant 1 minute à température ambiante.
4. Transférez le surnageant dans un tube de taille appropriée et mesurez le volume.
5. Ajoutez 2X le volume de tampon de dilution (ST1) pour une dilution 1:2 de l'échantillon de selles [ex : 1 ml de surnageant de selles + 2 ml de tampon de dilution (ST1)]. Utilisez cette dilution d'échantillons de selles pour les purifications d'ADN.

Remarque : pour extraire de l'ARN viral, diluez encore l'échantillon de selles à 1:8 dans de la Nuclease-Free Water (ex : 100 µl de dilution 1:2 d'échantillon de selles + 700 µl de Nuclease-Free Water). Stockez l'échantillon à température ambiante jusqu'à ce que vous soyez prêt pour le traitement.

Méthode facultative avec billes d'agitation pour l'extraction d'ADN d'agents pathogènes difficiles à lyser dans des échantillons de selles

Remarque : une étape facultative avec billes d'agitation peut être réalisée pour l'extraction d'acides nucléiques d'agents pathogènes difficiles à lyser, tels que des bactéries gram-positives ou des protozoaires dans des échantillons de selles. Cette homogénéisation supplémentaire peut augmenter le rendement de purification des acides nucléiques si la méthode de lyse standard est insuffisante.

- a. Transférez 600 µl à 1 ml d'échantillon de selles dilué dans un tube de 2 ml contenant des billes et fermez le tube.
- b. Placez les tubes sur un vortexeur à plaque ou équivalent et vortexez ou agitez avec des billes à la vitesse maximale pendant 10 minutes.
- c. Centrifugez les tubes dans une microcentrifugeuse pendant 1 minute à la vitesse maximale afin de séparer les billes de l'échantillon.
6. Ajoutez 300 µl de lysat de selles dans un nouveau tube de 1,5 ml.
7. Ajoutez 300 µl de tampon de lyse et mélangez au vortex pendant 10 secondes.
8. Ajoutez 30 µl de solution de protéinase K et vortexez brièvement pour mélanger.
9. Incubez à 56 °C pendant 20 minutes.
10. Procédez à la préparation de la Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (section 6.E).

6.B. Préparation des échantillons de LBA ou d'expectorations à utiliser avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

1. Si l'échantillon de LBA ou d'expectorations est congelé, décongelez-le à température ambiante.
Remarque : pour réduire la viscosité des échantillons de LBA ou d'expectorations, diluez dans un volume égal de 1X PBS, homogénéisez mécaniquement ou diluez et homogénéisez avant le traitement.
2. Pour chaque échantillon, ajoutez 100–300 µl dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml. (Nous recommandons l'utilisation d'une pipette de grand diamètre). Utilisez de nouveaux cônes de pipettes pour chaque échantillon afin d'éviter que les échantillons se contaminent entre eux.
3. Ajoutez 12 µl de 1-Thioglycérol et pipetez pour mélanger.
Remarque : pipetez lentement car la solution est visqueuse.
4. Ajoutez 300 µl de tampon de lyse et mélangez en vortexant pendant 10 secondes.
5. Incubez à 95 °C pendant 5 minutes. Refroidissez sur la paillasse pendant 2 minutes.
6. Ajoutez 30 µl de solution de protéinase K et vortexez brièvement pour mélanger.
7. Incubez à 56 °C pendant 20 minutes.
8. Procédez à la préparation de la Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (section 6.E).

6.C. Préparation des échantillons d'urine à utiliser avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

Préparation de petits volumes d'échantillons (300 µl d'urine) :

1. Vortexez brièvement l'échantillon d'urine pour remettre en suspension les cellules déposées.
2. Pour chaque échantillon, ajoutez 300 µl d'urine dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml. Utilisez de nouveaux cônes de pipettes pour chaque échantillon afin d'éviter que les échantillons se contaminent entre eux.
3. Ajoutez 300 µl de tampon de lyse et mélangez en vortexant pendant 10 secondes.
4. Ajoutez 30 µl de solution de protéinase K et vortexez brièvement pour mélanger.
5. Incubez à 56 °C pendant 20 minutes.
6. Procédez à la préparation de la Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (section 6.E).

Préparation de grands volumes d'échantillons (30 ml d'urine) :

1. Vortexez brièvement l'échantillon d'urine pour remettre en suspension les cellules déposées.
2. Pour chaque échantillon, ajoutez 30 ml d'urine dans un tube de 50 ml. Utilisez de nouveaux cônes de pipettes pour chaque échantillon afin d'éviter que les échantillons se contaminent entre eux.
3. Centrifugez l'échantillon d'urine à $2\,000 \times g$ pendant 10 minutes.
4. Retirez le surnageant avec une pipette, en veillant à ne pas altérer l'agglomérat.
Remarque : du liquide peut être conservé pour préserver l'intégrité de l'agglomérat (jusqu'à 300 µl).
5. Ajoutez 300 µl de tampon de lyse au tube et remettez l'agglomérat en suspension en pipetant.
6. Transférez le lysat dans un tube de 1,5 ml.
7. Ajoutez 30 µl de solution de protéinase K et vortexez brièvement pour mélanger.
8. Incubez à 56 °C pendant 20 minutes.
9. Procédez à la préparation de la Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (section 6.E).

6.D. Préparation d'échantillons de plasma, de milieu de transport viral ou de milieu Pap à utiliser avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit

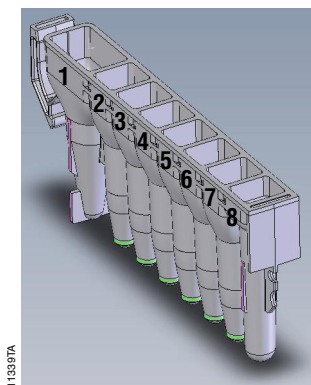
1. Si le plasma ou le milieu est congelé, décongelez-le à température ambiante et vortexez brièvement pour mélanger.
2. Pour chaque échantillon, ajoutez 300 µl de plasma ou de milieu contenant un échantillon biologique dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml. Utilisez de nouveaux cônes de pipettes pour chaque échantillon afin d'éviter que les échantillons se contaminent entre eux.
3. Ajoutez 300 µl de tampon de lyse et mélangez en vortexant pendant 10 secondes.
4. Ajoutez 30 µl de solution de protéinase K et vortexez brièvement pour mélanger.
5. Incubez à 56 °C pendant 20 minutes.
6. Procédez à la préparation de la Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge (section 6.E).

6.E. Préparation de la Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge

1. Changez de gants avant de manipuler les cartouches, les plongeurs et les tubes d'élution (0,5 ml). Placez les cartouches à utiliser dans le ou les plateaux avec le puits n°1 (le plus grand puits de la cartouche) orienté dans le sens opposé aux tubes d'élution. Appuyez sur la cartouche vers le bas pour bien la mettre en place. Retirez délicatement le joint afin de retirer tout le plastique du haut de la cartouche. Veillez à ce que toute la bande d'étanchéité et tout résidu d'adhésif soient retirés avec de placer les cartouches dans l'appareil.
2. Placez un plongeur dans le puits n°8 de chaque cartouche.
3. Placez un tube d'élution vide (0,5 ml) à la position du tube d'élution pour chaque cartouche dans le ou les plateaux.
4. Ajoutez 100 µl de tampon d'élution au fond de chaque tube d'élution.
5. Faites tourner brièvement les lysats des échantillons dans une microcentrifugeuse afin de recueillir le liquide au fond du tube. Transférez le lysat des échantillons dans le puits n°1 (le plus grand) de la cartouche. N'ajoutez rien d'autre que le lysat d'échantillon à la cartouche.
6. Passez à la Section 7, Installation et utilisation de l'appareil Maxwell®.

Remarques :

- a. Les échantillons ou réactifs renversés sur toute partie du plateau doivent être nettoyés avec une solution d'eau et de détergent, puis une lingette ou un spray bactéricide et enfin de l'eau. N'utilisez pas d'eau de Javel sur les pièces de l'appareil.
- b. Utilisez uniquement les tubes d'élution de 0,5 ml fournis dans le kit ; les autres tubes peuvent être incompatibles avec le Maxwell® Instrument.



L'utilisateur ajoute dans les puits

1. Lysat des échantillons
8. Plongeur CSC/RSC

Figure 1. Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Cartridge. Un échantillon prétraité est ajouté au puits n°1 et un plongeur est ajouté au puits n°8.

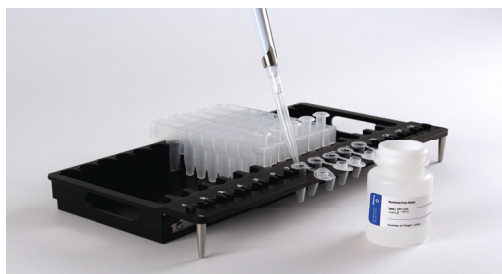


Figure 2. Installation et configuration du ou des plateaux. Un tampon d'élution est ajouté aux tubes d'élution comme illustré. Les plongeurs se trouvent dans le puits n°8 de la cartouche.

7. Installation et utilisation de l'appareil Maxwell®

Vous trouverez des informations détaillées dans le manuel technique spécifique à votre appareil Maxwell® (voir le Tableau 1).

1. Démarrez le Maxwell® Instrument et la tablette. Connectez-vous à la tablette et démarrez le logiciel Maxwell® en mode IVD en touchant deux fois l'icône sur le bureau. L'appareil démarre, réalise un autotest et place toutes les pièces mobiles en position de repos.
2. Touchez **Démarrer** pour lancer le processus d'exécution d'une méthode.
3. Scannez ou saisissez le code barres de la méthode dans l'angle supérieur droit de l'étiquette du Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit pour sélectionner automatiquement la méthode à utiliser (Figure 3).

Remarque : le code barres du Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit est nécessaire pour la purification sur les Maxwell® CSC Instruments. L'étiquette du kit contient deux codes barres. Le code barres de la méthode est indiqué à la Figure 3 ci-dessous. S'il n'est pas possible de scanner le code barres, contactez Promega Technical Services.



Figure 3. Étiquette de kit indiquant le code barres de méthode à scanner. Le code barres à scanner pour lancer un cycle de purification est indiqué dans le rectangle rouge en haut à droite de l'étiquette du kit.

4. Sur l'écran « Configuration des cartouches », touchez les positions de cartouches pour sélectionner ou désélectionner toute position à utiliser pour ce cycle d'extraction. Entrez toute information de suivi des échantillons requise et appuyez sur le bouton **Continuer**.

Remarque : lors de l'utilisation des Maxwell® Instruments à 48 positions, appuyez sur les boutons **Avance** et **Recul** pour sélectionner ou désélectionner les positions des cartouches sur chaque plateau.

5. Une fois la porte ouverte, confirmez que tous les éléments de la liste de contrôle d'extraction ont été réalisés. Vérifiez que les échantillons ont été ajoutés au puits n°1 des cartouches, que les cartouches sont chargées sur l'appareil, que des tubes d'élution débouchés sont présents avec le tampon d'élution et que les plongeurs sont dans le puits n°8. Transférez le ou les plateaux contenant les cartouches préparées sur la plateforme de l'appareil Maxwell®.

Insertion du portoir de la plateforme Maxwell® : tenez le plateau par les côtés pour éviter de déplacer les cartouches. Veillez à ce que le portoir soit placé dans le Maxwell® Instrument avec les tubes d'élution les plus proches de la porte. Inclinez l'arrière du plateau vers le bas et placez-le dans l'appareil de sorte que l'arrière du plateau repose contre l'arrière de la plateforme de l'appareil. Appuyez sur l'avant du plateau vers le bas pour bien installer le plateau sur la plateforme de l'appareil. Si vous avez des difficultés à installer le plateau sur la plateforme, vérifiez l'orientation correcte du plateau. Vérifiez que le plateau est à plat sur la plateforme de l'appareil et bien en place.

Remarque : vérifiez l'identifiant sur le ou les plateaux Maxwell® à 24 positions afin de déterminer s'ils doivent être placés à l'avant ou à l'arrière de l'appareil.

6. Confirmez que l'ensemble du prétraitement indiqué a été réalisé et touchez Démarrer pour fermer la porte de l'appareil et lancer le traitement.

Remarque : lorsque vous utilisez un Maxwell® Instrument à 48 positions, si le système Vision a été activé, le ou les plateaux seront scannés lors du retrait de la porte. Toute erreur de configuration des plateaux (ex : plongeurs pas dans le puits n°8, tubes d'élution absents ou ouverts) entraîne un retour du logiciel à l'écran « Configuration des cartouches » et les positions qui posent problème sont repérées par un point d'exclamation dans un cercle rouge. Touchez le point d'exclamation pour obtenir une description de l'erreur et résoudre tous les états d'erreur. Touchez à nouveau le bouton **Démarrer** pour scanner à nouveau le plateau et lancer le cycle d'extraction.



Avertissement : risque de pincement.

L'appareil Maxwell® lance immédiatement le cycle de purification. L'écran affiche des informations y compris l'utilisateur qui a lancé le cycle, l'étape actuelle de la méthode et la durée restante approximative du cycle.

Remarques :

- a. Le bouton **Annuler** permet de mettre fin au cycle. Tous les échantillons d'un cycle abandonné seront perdus.
- b. Si le cycle est abandonné avant la fin, il pourra vous être demandé de vérifier si les plongeurs sont encore chargés sur la barre de plongeurs. Si des plongeurs sont présents sur la barre, vous devez réaliser le **Nettoyage** lorsque cela vous est demandé. Si aucun plongeur n'est présent sur la barre, vous pouvez choisir de ne pas réaliser le **Nettoyage**. Les échantillons seront perdus. N'essayez pas de décontaminer à nouveau les échantillons si un cycle de l'appareil a été interrompu.

7. Installation et utilisation de l'appareil Maxwell® (suite)

7. Suivez les instructions à l'écran à la fin de la méthode pour ouvrir la porte. Vérifiez que les plongeurs sont situés dans le puits n°8 de la cartouche à la fin du cycle. Si les plongeurs ne sont pas retirés de la barre, suivez les instructions du manuel technique approprié à votre Maxwell® Instrument (Tableau 1) pour réaliser une procédure d'**Éjection des plongeurs** afin d'essayer de décharger les plongeurs.
8. Retirez le ou les plateaux de l'appareil. Retirez les tubes d'élution contenant les acides nucléiques totaux pathogènes et bouchez les tubes. Si des particules paramagnétiques sont présentes dans les tubes d'élution, centrifugez à $10\,000\text{--}20\,000 \times g$ pendant 30 secondes à 1 minute, puis transférez le surnageant dans des tubes de stockage (non fournis). Une fois le cycle terminé, le rapport du cycle d'extraction sera affiché. L'écran « Vue du rapport » permet d'imprimer et/ou d'exporter ce rapport.
9. Retirez les cartouches et les plongeurs du ou des plateaux et mettez-les au rebut comme déchets dangereux conformément aux recommandations de votre établissement. Ne réutilisez pas les cartouches de réactif, les plongeurs ou les tubes d'élution.

Remarque : assurez-vous que les échantillons sont retirés avant tout traitement aux UV requis de l'appareil pour éviter d'endommager les acides nucléiques.

8. Stockage des acides nucléiques élués

Si les échantillons ne sont pas traités immédiatement, stockez l'ADN pathogène élué sur de la glace ou à 4 °C jusqu'à 24 heures. Pour un stockage de plus longue durée, congelez à -20 °C ou -70 °C. L'ARN est moins stable. Il est préférable de le tester en réalisant des essais immédiatement après l'isolement. Si le test est réalisé rapidement après l'isolement, stockez l'ARN pathogène sur de la glace ou à 4 °C. Autrement, stockez l'ARN pathogène élué à -70 °C. Consultez les recommandations spécifiques au stockage et au traitement des échantillons dans les instructions pour les applications en aval.

9. Évaluation des performances analytiques

L'évaluation des performances analytiques du Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit a été réalisée avec divers types d'échantillons traités avec des agents pathogènes inactivés traités sur les Maxwell® CSC et Maxwell® CSC 48 Instruments.

9.A. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ADN

De l'acide nucléique total a été extrait de répétitions de 300 µl d'une suspension de selles, chacune ayant été traitée avec environ $2,5 \times 10^4$ copies de *Giardia lamblia* inactivé selon la méthode standard ou la méthode de prétraitement avec billes d'agitation. L'acide nucléique total a été élué avec 100 µl de tampon d'élution. Cinq microlitres de chaque éluat non dilué ont été utilisés dans un essai qPCR pour amplifier une cible d'ADN spécifique à *G. lamblia*. Le C_q moyen généré avec la méthode standard était de 34,39 cycles. Le C_q moyen généré avec la méthode avec billes d'agitation était de 29,35 cycles.

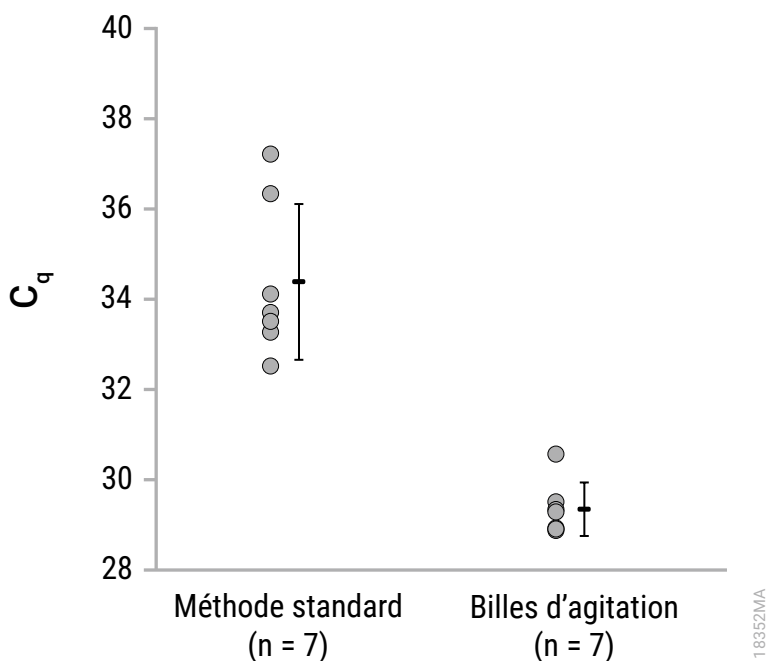


Figure 4. Amplification de la séquence d'ADN cible de *G. lamblia* avec de l'acide nucléique total extrait d'échantillons de selles avec la méthode standard et avec la méthode avec billes d'agitation.

9.B. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ARN

Pour démontrer que les performances du Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit sont similaires avec le Maxwell® CSC ou le Maxwell® CSC 48 Instrument, de l'acide nucléique total a été extrait en utilisant le kit avec les deux appareils à partir de huit répétitions de 300 µl d'échantillons d'expectorations traités avec 1×10^4 copies de virus SARS CoV-2 inactivé. L'acide nucléique total a été élué dans 100 µl de tampon d'élution et 5 µl de chaque éluat ont été utilisés dans un essai RT-qPCR pour amplifier une séquence d'ARN cible spécifique au SARS CoV-2. La comparaison des résultats RT-qPCR obtenus à partir d'acide nucléique total extrait avec le Maxwell® CSC Instrument et le Maxwell® CSC 48 Instrument a montré que toutes les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient $\leq 0,59$ cycle, avec une valeur $|\Delta C_q|$ moyenne de 0,16 cycle.

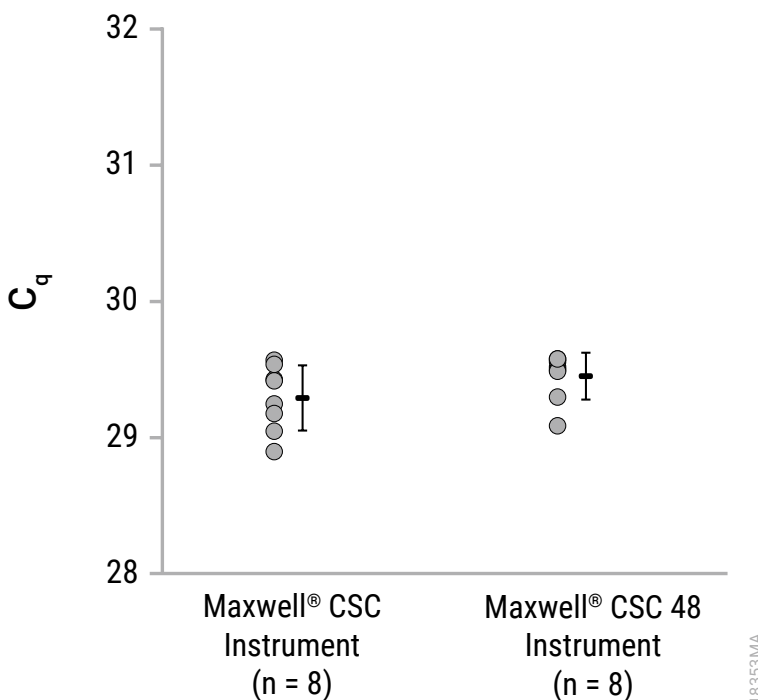


Figure 5. Amplificabilité de l'acide nucléique total extrait d'échantillons d'expectorations contenant SARS CoV-2 avec le Maxwell® CSC ou le Maxwell® CSC 48 Instrument.

L'acide nucléique total a été purifié en parallèle à partir d'échantillons de lavage broncho-alvéolaire (LBA) de 100 µl et de 300 µl, chacun traité avec 1×10^4 copies de virus SARS CoV-2 inactivé afin d'évaluer l'effet de différentes quantités de matrice d'échantillon sur l'amplificabilité. L'acide nucléique total a été élué dans 100 µl de tampon d'élué et 5 µl de chaque éluat non dilué ont été utilisés dans un essai RT-qPCR pour amplifier une séquence d'ARN cible spécifique au SARS CoV-2. Toutes les valeurs C_q pour l'acide nucléique total purifié à partir de 300 µl d'expectorations étaient $\leq 30,86$ cycles, avec une valeur C_q moyenne de 30,56 cycles. Toutes les valeurs C_q pour l'acide nucléique total purifié à partir de 100 µl de LBA étaient $\leq 29,93$ cycles, avec une valeur C_q moyenne de 29,74 cycles.

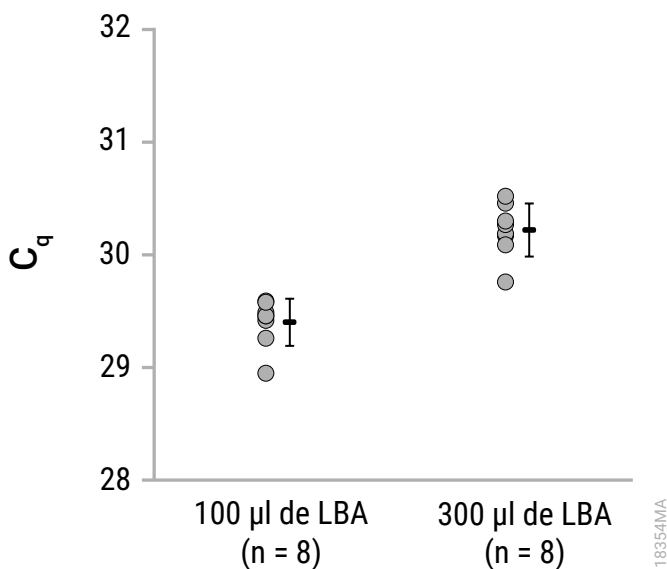


Figure 6. Amplification de la séquence d'ARN cible de SARS CoV-2 avec de l'acide nucléique total extrait de différents volumes d'entrée d'échantillon.

9.C. Reproductibilité

Pour évaluer la reproductibilité de l'extraction d'acide nucléique total avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit entre utilisateurs, trois utilisateurs ont traité cinq répétitions chacun de 300 µl de milieu de transport universel (UTM) traité avec *Bordetella pertussis*, et ont extrait de l'acide nucléique total dans le même cycle du Maxwell® CSC Instrument. Les acides nucléiques ont été élués dans 100 µl de tampon d'élué. Cinq microlitres de l'éluat non dilué ont été utilisés dans un essai qPCR afin d'amplifier une séquence d'ADN cible spécifique à *B. pertussis*, et la valeur C_q moyenne et l'écart-type ont été calculés. La purification d'acide nucléique total était reproductible, avec des écarts-types de 0,31 cycle (Utilisateur 1), 0,23 cycle (Utilisateur 2) et 0,40 cycle (Utilisateur 3). L'écart-type pour les trois utilisateurs était de 0,32 cycle.

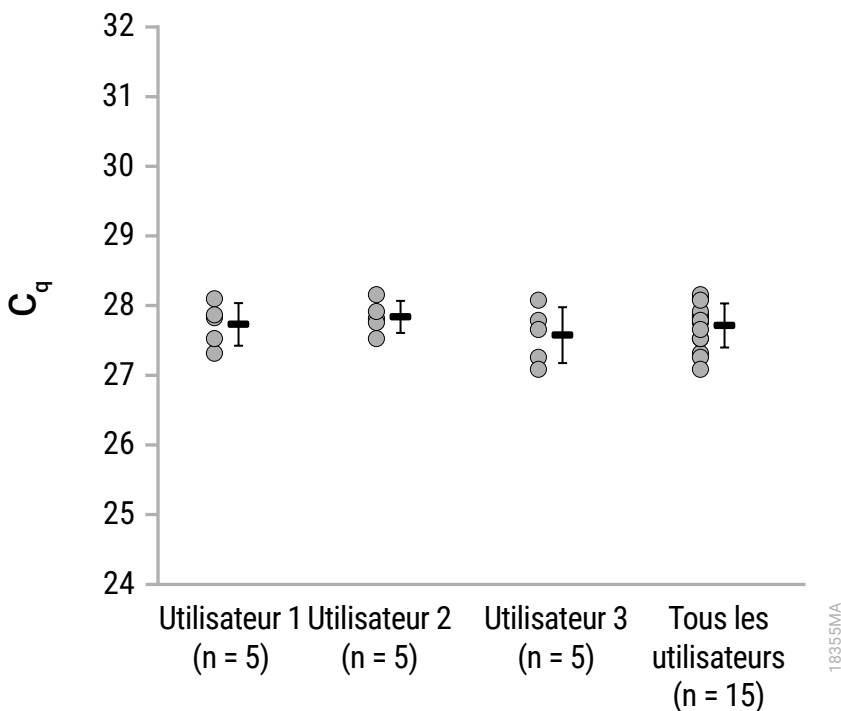


Figure 7. Reproductibilité de l'extraction d'acide nucléique total entre trois utilisateurs.

Pour évaluer la reproductibilité de l'extraction d'acide nucléique total entre différents cycles d'extraction, un seul utilisateur a réalisé trois cycles d'extraction d'acide nucléique total différents, chacun avec huit répétitions de 300 µl d'UTM traité avec *B. pertussis* avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit avec les Maxwell® CSC Instruments. L'acide nucléique total a été élué dans 100 µl de tampon d'élution pendant chacun des trois cycles. Cinq microlitres de l'éluat non dilué ont été utilisés dans un essai qPCR afin d'amplifier une séquence d'ADN cible spécifique à *B. pertussis*, et la valeur C_q moyenne et l'écart-type ont été calculés. La purification d'acide nucléique total était reproductible, avec des écarts-types de 0,25 cycle (Cycle 1), 0,40 cycle (Cycle 2) et 0,22 cycle (Cycle 3). L'écart-type pour les trois cycles était de 0,43 cycle.

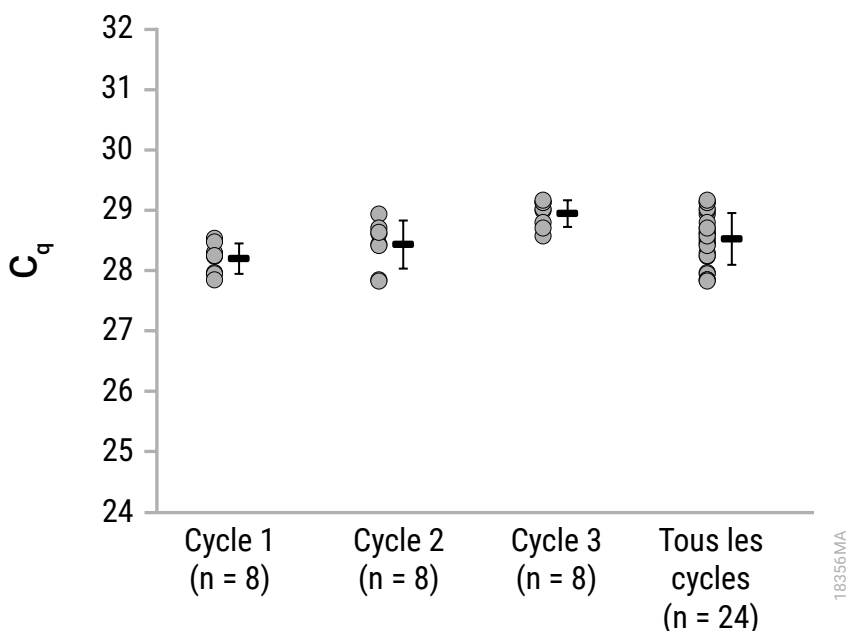


Figure 8. Reproductibilité de l'extraction d'acide nucléique total sur trois cycles d'extraction réalisés par un seul utilisateur.

9.C. Reproductibilité (suite)

Pour évaluer la reproductibilité de l'extraction d'acide nucléique total entre différents lots du Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit, l'acide nucléique total a été purifié à partir de répétitions de 300 µl d'UTM traité avec *B. pertussis* avec trois lots de kits, contenant chacun des lots uniques de réactifs critiques. Chaque éluat non dilué a été utilisé dans un essai qPCR afin d'amplifier une séquence d'ADN cible spécifique à *B. pertussis*, et la valeur Cq moyenne et l'écart-type ont été calculés. L'écart-type pour les valeurs Cq générées avec le Lot 1 était de 0,38 cycle, avec le Lot 2 de 0,30 cycle et avec le Lot 3 de 0,35 cycle. L'écart-type pour Cq sur les trois lots était de 0,34 cycle.

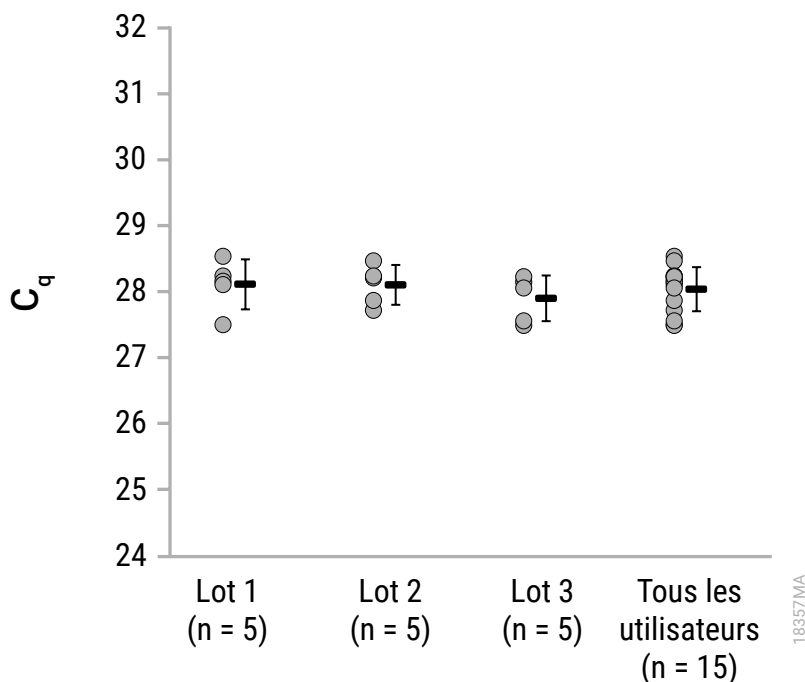


Figure 9. Reproductibilité de l'extraction d'acide nucléique total entre trois lots différents du Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.

9.D. Inhibition de l'amplification en raison de substances interférentes

Pour évaluer une éventuelle inhibition de l'amplification en raison de substances interférentes copurifiées avec l'acide nucléique, de l'acide nucléique total a été purifié à partir de huit répétitions de 300 µl de suspension de selles traitées avec 3×10^4 cellules de *Clostridium difficile* inactivé. Cinq microlitres de chaque acide nucléique total non dilué et 5 µl d'une dilution fois dix de chaque éluat ont été utilisés dans un essai qPCR pour amplifier une cible d'ADN spécifique à *C. difficile* afin d'évaluer l'effet de substances interférentes. Pour le Maxwell® CSC Instrument, toutes les valeurs C_q pour les éluats non dilués étaient $\leq 27,57$ cycles, avec une valeur C_q moyenne de 26,93 cycles. Pour le Maxwell® CSC 48 Instrument, toutes les valeurs C_q pour les éluats non dilués étaient $\leq 27,24$ cycles, avec une valeur C_q moyenne de 27,03 cycles. Les valeurs C_q des éluats non dilués et des éluats dilués dix fois ont été comparées afin d'évaluer l'inhibition au sein de différents éluats avec un ΔC_q attendu $>2,5$ cycles, ce qui indique l'absence d'inhibition. Le ΔC_q des éluats non dilués et dilués dix fois pour différents échantillons étaient compris entre 3,24 et 3,59, ce qui indique que toute substance interférente présente dans l'éluat produit une inhibition minimale.

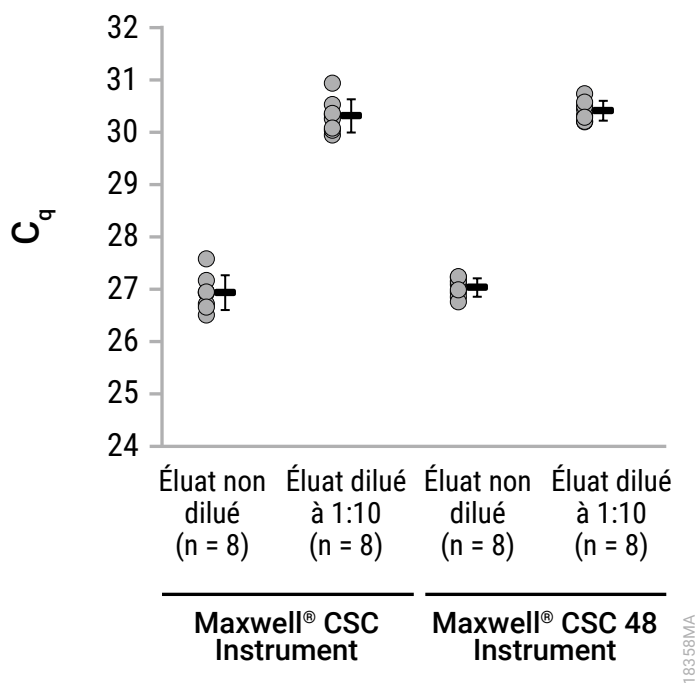


Figure 10. Évaluation de l'inhibition de l'amplification de l'acide nucléique total extrait avec le Maxwell® CSC ou le Maxwell® CSC 48 Instrument.

9.D. Inhibition de l'amplification en raison de substances interférentes (suite)

De l'acide nucléique total a été extrait a été extrait de huit répétitions de 300 µl d'échantillons d'expectorations ou de LBA traités avec 9×10^4 copies de *Chlamydia pneumoniae* inactivé et élués dans 100 µl de tampon d'éluion. Cinq microlitres de chaque acide nucléique total non dilué et 5 µl d'une dilution fois dix de chaque éluat ont été utilisés dans un essai qPCR pour amplifier une cible d'ADN spécifique à *C. pneumoniae* afin d'évaluer l'effet de substances interférentes.

Toutes les valeurs C_q pour les éluats d'acide nucléique total non dilués à partir d'expectorations étaient $\leq 26,59$ cycles, avec une valeur C_q moyenne de 26,48 cycles. La valeur C_q moyenne pour une dilution de 1:10 d'éluats d'acide nucléique à partir d'expectorations était de 29,83 cycles, avec une différence de 3,35 cycles entre les valeurs C_q moyennes pour les échantillons dilués et non dilués. Toutes les valeurs C_q pour les éluats non dilués à partir de LBA étaient $\leq 26,64$ cycles, avec une valeur C_q moyenne de 26,41 cycles. La valeur C_q moyenne pour une dilution de 1:10 d'éluats d'acide nucléique à partir de LBA était de 29,83 cycles, avec une différence de 3,42 cycles entre les valeurs C_q moyennes pour les échantillons dilués et non dilués, ce qui indique que toute substance interférente présente dans l'éluat produit une inhibition minimale.

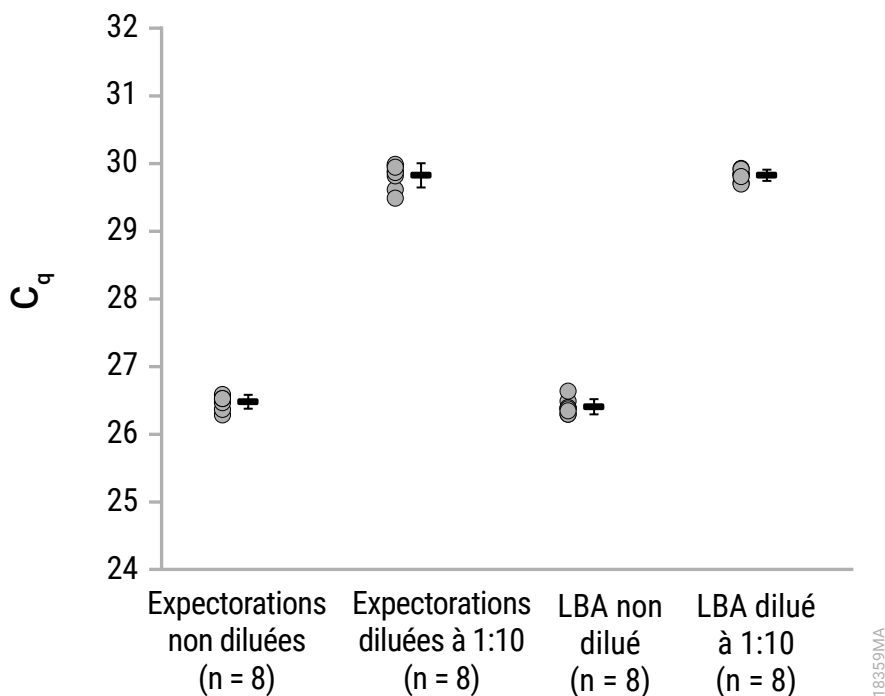


Figure 11. Évaluation de l'inhibition de l'amplification de l'acide nucléique total extrait d'échantillons d'expectorations et de LBA.

L'inhibition de l'amplification a été évaluée en extrayant de l'acide nucléique total d'échantillons d'UTM traités avec *B. pertussis* inactivé et en amplifiant par qPCR l'acide nucléique total obtenu. Brièvement, de l'acide nucléique total a été extrait de huit répétitions de 300 µl d'UTM traité avec environ 1×10^4 copies de *B. pertussis* inactivé et élué dans 100 µl de tampon d'éluat. Cinq microlitres de chaque acide nucléique total non dilué et 5 µl d'une dilution fois dix de chaque éluat ont été utilisés dans un essai qPCR pour amplifier une cible d'ADN spécifique à *B. pertussis* afin d'évaluer l'effet de substances interférentes. La valeur C_q moyenne pour les éluats non dilués obtenus ç partir d'échantillons d'UTM était de 25,97 cycles. La valeur C_q moyenne pour une dilution de 1:10 des éluats était de 29,49 cycles, avec une différence de 3,52 cycles entre les valeurs C_q moyennes pour les échantillons dilués et non dilués, ce qui indique que toute substance interférente présente dans l'éluat produit une inhibition minimale.

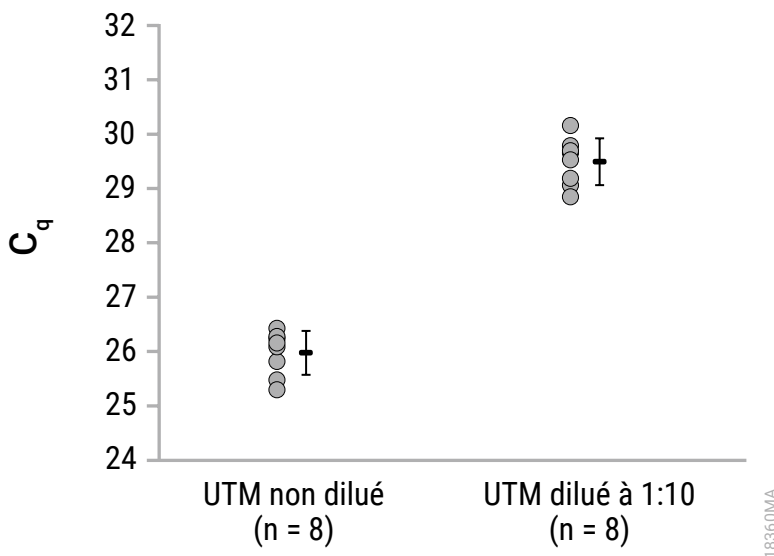


Figure 12. Évaluation de l'inhibition de l'amplification de l'acide nucléique total extrait d'échantillons d'UTM traités avec *B. pertussis*.

9.D. Inhibition de l'amplification en raison de substances interférentes (suite)

L'inhibition de l'amplification a été évaluée en extrayant de l'acide nucléique total d'échantillons d'UTM traités avec le virus Herpes simplex 1 (HSV-1) inactivé. De l'acide nucléique total a été extrait de huit répétitions de 300 µl d'UTM traité avec environ 1×10^5 copies de HSV-1 inactivé et élué dans 100 µl de tampon d'éluat. Cinq microlitres de chaque acide nucléique total non dilué et 5 µl d'une dilution fois dix de chaque éluat ont été utilisés dans un essai qPCR pour amplifier une cible d'ADN spécifique à HSV-1 afin d'évaluer l'effet de substances interférentes. Toutes les valeurs Cq pour les éluats non dilués étaient $\leq 27,25$ cycles, avec une valeur Cq moyenne de 26,88 cycles. Le ΔCq des éluats non dilués et dilués dix fois pour différents échantillons étaient compris entre 3,44 et 3,91, ce qui indique que toute substance interférente présente dans l'éluat produit une inhibition minime.

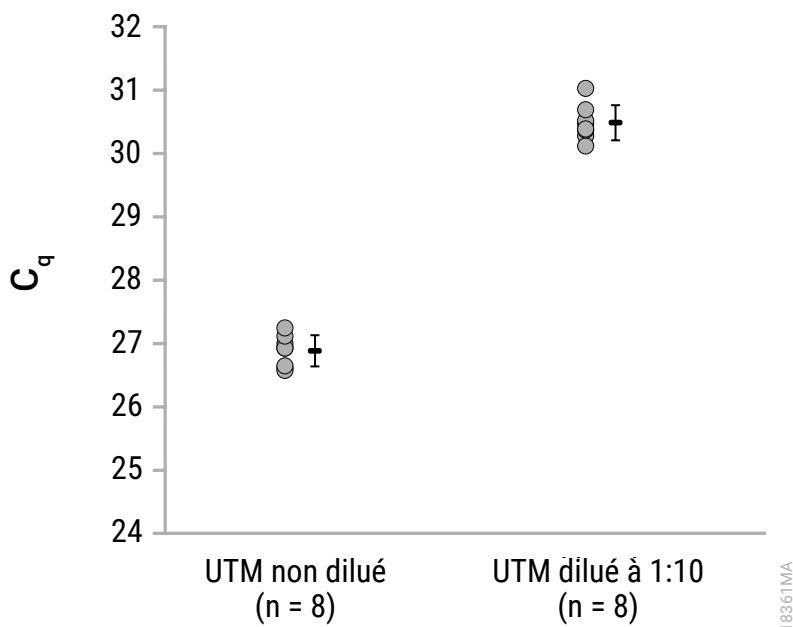


Figure 13. Évaluation de l'inhibition de l'amplification de l'acide nucléique total extrait d'échantillons d'UTM traités avec HSV-1.

9.E. Contamination croisée

La contamination croisée a été évaluée avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit et le Maxwell® CSC Instrument en alternant les Maxwell® CSC Cartridges contenant des échantillons d'UTM traités avec *B. pertussis* inactivé et des échantillons d'UTM négatifs sans ajout de *B. pertussis* sur le portoir de la plateforme Maxwell® sur un seul cycle d'extraction d'acide nucléique total. Les éluats des échantillons d'UTM positifs et négatifs *B. pertussis* ont été utilisés dans un essai qPCR pour amplifier une cible d'ADN spécifique à *B. pertussis*, et les valeurs C_q obtenues ont été comparées à une courbe standard (10^1 – 10^6 copies) générée au moyen de dilutions en série d'un ADN synthétique avec la séquence cible *B. pertussis*. Tous les éluats d'UTM avec ajout de *B. pertussis* avaient des valeurs C_q sur la courbe standard, avec une valeur C_q moyenne de 25,42 cycles. Tous les éluats d'UTM négatifs sans ajout de *B. pertussis* avaient des valeurs C_q supérieures à la valeur C_q obtenue à partir de la plus faible concentration d'ADN sur la courbe standard (10 copies).

10. Évaluation des performances cliniques

L'évaluation des performances cliniques du Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit a été réalisée par un laboratoire clinique externe avec le Maxwell® CSC 48 Instrument afin d'extraire de l'acide nucléique pathogène des types d'échantillons cliniques spécifiés ci-dessous, et en amplifiant l'acide nucléique dans un essai cliniquement adapté.

Tableau 2. Extraction de l'acide nucléique total de *Clostridium difficile* d'échantillons de selles. De l'acide nucléique total a été extrait par un testeur de 200 mg de dix échantillons de selles humaines *Clostridium difficile* (*C. difficile*) positifs et de dix échantillons de selles humaines *C. difficile* négatifs avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. L'acide nucléique a également été purifié à partir de ces échantillons à l'aide de la méthode de référence de purification standard du laboratoire. Les éluats obtenus ont été analysés en amplifiant les cibles d'ADN *C. difficile* Toxin A et Toxin B dans un essai qPCR. L'acide nucléique extrait de tous les échantillons présumés *C. difficile* négatifs et *C. difficile* positifs purifiés avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit a donné le résultat attendu et présenté une concordance avec les résultats obtenus à partir de l'acide nucléique extrait avec la méthode de référence d'extraction du laboratoire.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Méthode de référence du laboratoire
Échantillons correspondant à l'état <i>C. difficile</i> négatif	10/10	10/10
Échantillons correspondant à l'état <i>C. difficile</i> positif	10/10	10/10

10. Évaluation des performances cliniques (suite)

Tableau 3. Extraction d'acide nucléique total de cytomégalovirus d'échantillons de lavage broncho-alvéolaire (LBA).

De l'acide nucléique total a été extrait par un testeur de dix échantillons de LBA humains cytomégalovirus (CMV) positifs (100 µl et 300 µl) et de dix échantillons de LBA humains CMV négatifs (300 µl) avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Par ailleurs, de l'acide nucléique total a été extrait de 300 µl des dix mêmes échantillons de LBA CMV positifs et des dix mêmes échantillons de LBA CMV négatifs à l'aide de la méthode de référence de purification standard du laboratoire. Les éluats obtenus ont été analysés en amplifiant la cible d'ADN du gène précoce-immédiat majeur du CMV dans un essai qPCR. L'acide nucléique extrait de tous les échantillons présumés CMV négatifs et CMV positifs (100 µl et 300 µl) purifiés avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit a donné le résultat attendu et présenté une concordance avec les résultats obtenus à partir de l'acide nucléique extrait avec la méthode de référence d'extraction du laboratoire.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Méthode de référence du laboratoire
Échantillons correspondant à l'état CMV négatif	10/10 pour un volume d'entrée de 300 µl	10/10 pour un volume d'entrée de 300 µl
Échantillons correspondant à l'état CMV positif	10/10 pour un volume d'entrée de 100 µl 10/10 pour un volume d'entrée de 300 µl	10/10 pour un volume d'entrée de 300 µl

Tableau 4. Extraction de l'acide nucléique total du SARS-CoV-2 d'échantillons de milieu de transport viral (MTV).

Deux testeurs ont extrait de l'acide nucléique total de 300 µl de MTV qui contenait un échantillon de prélèvement nasopharyngé. De l'acide nucléique total a été extrait de dix échantillons de MTV humain SARS CoV-2 positifs et de dix échantillons de MTV humain SARS CoV-2 négatifs par deux testeurs avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. Un testeur a aussi extrait de l'acide nucléique de ces échantillons à l'aide de la méthode de référence de purification standard du laboratoire. Les éluats obtenus ont été analysés en amplifiant les gènes N et RdRP SARS CoV-2 dans un essai qPCR. L'acide nucléique extrait de tous les échantillons SARS CoV-2 négatifs et SARS CoV-2 positifs purifiés par les deux testeurs avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit a donné le résultat attendu et présenté une concordance avec les résultats obtenus à partir de l'acide nucléique extrait avec la méthode de référence d'extraction du laboratoire.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Méthode de référence du laboratoire
Échantillons correspondant à l'état SARS-CoV-2 négatif	10/10 pour le testeur A 10/10 pour le testeur B	10/10
Échantillons correspondant à l'état SARS-CoV-2 positif	10/10 pour le testeur A 10/10 pour le testeur B	10/10

Tableau 5. Extraction de l'acide nucléique total du papillomavirus humain d'échantillons de milieu Pap. Un testeur a extrait de l'acide nucléique de 300 µl d'échantillons de milieu PAP ThinPrep® qui contenaient un brossage cervical prélevé sur des patients humains. De l'acide nucléique total a été extrait de neuf échantillons humains de milieu papillomavirus (HPV) positif et de neuf échantillons humains de milieu Pap HPV négatif avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. L'acide nucléique a également été extrait à partir des mêmes échantillons à l'aide de la méthode de référence de purification standard du laboratoire. Les éluats obtenus ont été analysés en amplifiant les cibles d'ADN HPV-16, HPV-18 et à haut risque HPV dans un essai qPCR. L'acide nucléique extrait de tous les échantillons de milieu Pap HPV positif extraits avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit a donné le résultat attendu et présenté une concordance avec les résultats obtenus à partir de l'acide nucléique extrait avec la méthode de référence d'extraction du laboratoire.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Méthode de référence du laboratoire
Échantillons correspondant à l'état HPV négatif	9/9	9/9
Échantillons correspondant à l'état HPV positif	9/9	9/9

Tableau 6. Extraction d'acide nucléique total de cytomégalovirus d'échantillons d'urine. De l'acide nucléique total a été extrait par un testeur de 300 µl de dix échantillons d'urine humaine CMV positifs et de dix échantillons d'urine humaine CMV négatifs avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. L'acide nucléique a également été extrait à partir des mêmes échantillons à l'aide de la méthode de référence de purification standard du laboratoire. Les éluats obtenus ont été analysés en amplifiant la cible d'ADN du gène précoce-immédiat majeur du CMV dans un essai qPCR. Tous les échantillons d'urine humaine CMV négatifs et neuf des dix échantillons d'urine humaine CMV positifs ont présenté une concordance avec les résultats obtenus avec de l'acide nucléique extrait par la méthode de référence d'extraction du laboratoire. Un échantillon d'urine présumé CMV positif était discordant entre les deux méthodes de purification avec un résultat négatif pour le système de purification Maxwell® CSC et un résultat positif faible (plus faible valeur C_q de 36,26 pour quatre répétitions avec un résultat positif sur un total de cinq répétitions testées) avec la méthode de référence du laboratoire.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Méthode de référence du laboratoire
Échantillons correspondant à l'état CMV négatif	10/10	10/10
Échantillons correspondant à l'état CMV positif	9/10	10/10

10. Évaluation des performances cliniques (suite)

Tableau 7. Extraction d'acide nucléique total de cytomégalo­virus d'échantillons de plasma. De l'acide nucléique total a été extrait par un testeur de 300 µl de dix échantillons de plasma humain CMV positifs et de dix échantillons de plasma humain CMV négatifs avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit. L'acide nucléique a également été extrait à partir des mêmes échantillons à l'aide de la méthode de référence de purification standard du laboratoire. Les éluats obtenus ont été analysés en amplification du la cible d'ADN du gène précoce-immédiat majeur du CMV dans un essai qPCR. L'acide nucléique extrait de tous les échantillons de plasma humain CMV négatifs et CMV positifs purifiés avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit a donné le résultat attendu et présenté une concordance avec les résultats obtenus à partir de l'acide nucléique extrait avec la méthode de référence d'extraction du laboratoire.

	Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid System	Méthode de référence du laboratoire
Échantillons correspondant à l'état CMV négatif	10/10	10/10
Échantillons correspondant à l'état CMV positif	10/10	10/10

La contamination croisée survenue dans l'environnement utilisateur prévu avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit a été évaluée en alternant les Maxwell® CSC Cartridges contenant des échantillons de plasma humain CMV positifs et CMV négatifs sur le portoir de la plateforme Maxwell® CSC 48 Instrument sur un seul cycle d'extraction d'acide nucléique total. Aucune contamination croisée n'a été observée car les échantillons négatifs ont produit un résultat négatif dans un essai qPCR pour une cible d'ADN CMV.

11. Création d'un environnement sans ribonucléase

Les ribonucléases sont extrêmement difficiles à inactiver. Veillez à éviter d'introduire une activité RNase dans les échantillons d'acide nucléique total contenant de l'ARN pendant et après l'isolement. C'est particulièrement important si le produit de départ a été difficile à obtenir ou est irremplaçable. Les remarques suivantes peuvent contribuer à éviter une contamination accidentelle de vos échantillons avec du RNase.

1. Deux des principales sources de contamination par RNase sont les mains de l'utilisateur et les bactéries ou les moisissures qui peuvent être présentes sur les particules de poussière en suspension dans l'air. Pour éviter ces sources de contamination, utilisez une technique stérile lors de la manipulation des réactifs fournis avec ce système. Portez des gants en permanence. Changez de gants immédiatement si vous avez pu être en contact avec des ribonucléases.
2. Dès que possible, utilisez des matières plastiques stériles jetables pour manipuler de l'acide nucléique total contenant de l'ARN. Ces matières sont généralement exemptes de RNase et ne nécessitent pas de prétraitement pour inactiver le RNase.
3. Traitez le verre, le plastique et les chambres d'électrophorèse non stériles avant de les utiliser pour garantir l'absence de RNase. Chauffez le verre à 200 °C pendant la nuit et rincez abondamment les plastiques avec 0,1 N de NaOH, 1 mM d'EDTA puis de l'eau exempte de RNase. Il est également possible d'utiliser des produits d'élimination de RNase du commerce selon les instructions du fabricant.

Remarque : les chambres d'électrophorèse peuvent être contaminées avec des ribonucléases, en particulier le RNase A, issus de l'analyse d'échantillons d'ADN. Dès que possible, mettez de côté un équipement neuf ou décontaminé pour l'analyse de l'ARN uniquement.

4. Traitez les solutions non fournies avec le système en ajoutant du pyrocarbonate de diéthyle (DEPC) à 0,1 %v/v dans une hotte. Laissez incuber une nuit sous agitation et à température ambiante dans la hotte. Passez à l'autoclave pendant 30 minutes pour éliminer toute trace de DEPC.



Mise en garde : le DEPC est un produit cancérigène présumé et ne doit être utilisé que dans une hotte chimique. Le DEPC réagit rapidement avec les amines et ne peut pas être utilisé pour traiter les tampons Tris.

Remarque : pour toutes les applications en aval, il est essentiel de continuer à protéger vos échantillons d'ARN contre les RNases. Portez des gants propres et utilisez des solutions et des tubes centrifuges exempts de RNase.

12. Références

1. Clinical Laboratory Standards Institute (2020) CLSI MM13–Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods. Deuxième édition.
2. Baron, E.J. (2015) Specimen collection, transport, and processing: Bacteriology. Dans : *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*. Consulté le 2 novembre 2022 à l'adresse : www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html
4. Centers for Disease Control and Prevention. *Stool Specimens - Molecular Diagnosis*. Consulté le 2 novembre 2022 à l'adresse : www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/stool/moleculardx.html

13. Dépannage

Pour les questions qui ne sont pas abordées ici, contactez votre succursale ou distributeur local Promega.

Les coordonnées sont disponibles à l'adresse : www.promega.com. E-mail : techserv@promega.com

Symptômes	Causes et commentaires
Récupération des acides nucléiques pathogènes plus faible que prévu (ex : pour les témoins internes fournis par le client)	Les échantillons de départ ont été compromis. Vérifiez que les échantillons ont été prélevés, expédiés et stockés conformément aux directives recommandées. Pour les échantillons d'ARN viral, veillez à préparer les échantillons et à réaliser les essais dans des conditions sans RNase, y compris des tubes et cônes de pipettes sans RNase. L'étape de traitement n'était pas optimale. • Utilisez uniquement le tampon de lyse fourni avec ce kit. • Un mélange incomplet peut réduire la lyse. Vortexez l'échantillon avec la solution de lyse conformément aux recommandations. • Traitement incomplet de la protéase pour retirer les capsides virales et/ou les protéines des bactéries et des parasites. Vérifiez la température du bloc chauffant ou du bain d'eau et laissez incuber pendant la durée recommandée. • Il est possible d'utiliser l'étape facultative avec billes d'agitation lors du traitement de pathogènes difficiles à lyser (parasites ou bactéries gram-positives) dans des selles. • Vérifiez que du 1-Thioglycérol a été ajouté pour le prétraitement des échantillons de LBA ou d'expectorations. L'omission de 1-Thioglycérol peut affecter négativement les rendements. • L'ajout d'une quantité d'échantillon supérieure à la recommandation peut réduire la récupération des acides nucléiques. Vérifiez qu'un plongeur a été ajouté à la cartouche. Problèmes de stockage après la purification. • Retirez les éluats et stockez à la température recommandée immédiatement après le cycle de l'appareil Maxwell®. • Ne faites pas subir plusieurs cycles de congélation-décongélation aux éluats avant des essais ultérieurs. Les témoins internes d'acides nucléiques de taille inférieure à 100 bp risquent de ne pas être purifiés efficacement avec ce système. L'utilisateur est tenu de valider la performance de tout témoin interne.

Symptômes

Causes et commentaires

Faible amplification	L'incorporation de particules paramagnétiques peut provoquer une interférence dans les réactions d'amplification. Centrifugez ou utilisez la séparation magnétique pour retirer les particules dans le tube d'élution. Un mauvais tampon d'élution a été ajouté. Utilisez uniquement le tampon d'élution fourni avec le Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit.
Contamination croisée	Utilisez de nouveaux cônes de pipettes pour chaque échantillon afin d'éviter que les échantillons se contaminent entre eux. Évitez d'éclabousser lorsque vous ajoutez des lysats aux cartouches. Vous pouvez retirer les cartouches du plateau pour ajouter les échantillons afin de réduire autant que possible la contamination des cartouches adjacentes.
L'appareil ne peut pas récupérer les plongeurs	Veillez à utiliser un kit de chimie spécifique Maxwell® CSC ; les plongeurs pour les kits de réactifs Maxwell® CSC sont spécifiques aux appareils Maxwell® pris en charge pour ce kit.

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif qui a entraîné, ou pourrait entraîner, le décès ou une grave blessure d'un utilisateur ou patient doit être signalé immédiatement au fabricant. Les utilisateurs installés dans l'Union Européenne devraient également signaler tout incident grave à l'Autorité Compétente de l'État Membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

14. Produits apparentés

Instruments et accessoires

Produit	Taille	Cat. #
Maxwell® CSC Instrument	1 chacun	AS6000
Maxwell® CSC 48 Instrument	1 chacun	AS8000
Maxwell® RSC/CSC Plungers, pack de 50	1 chacun	AS1331
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 chacun	SP6019
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 chacun	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 chacun	AS8402
ClickFit Microtube, 1,5 ml	1 000/pack	V4741

Kits de réactifs Maxwell® CSC

Visitez www.promega.com pour une liste des kits de purification Maxwell® CSC disponibles.



^(a)Numéro de brevet américain 7 329 488 et numéro de brevet coréen 100483684.

© 2022 Promega Corporation. Tous droits réservés.

Maxwell est une marque déposée de Promega Corporation.

ThinPrep est une marque déposée de Hologic, Inc.

Les produits peuvent être couverts par des brevets publiés ou en attente d'approbation ou peuvent présenter certaines limites. Veuillez consulter notre site Web pour plus d'informations. Tous les prix et spécifications peuvent être modifiés sans préavis.

Les allégations concernant les produits peuvent être modifiées. Veuillez contacter Promega Technical Services ou accéder au catalogue en ligne de Promega pour bénéficier des informations les plus récentes sur les produits Promega.