

MANUAL TÉCNICO

Maxwell[®] CSC Blood DNA Kit

Instrucciones de uso del producto
AS1321

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

Maxwell[®] CSC Blood DNA Kit

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

1. Descripción	2
2. Componentes del producto, condiciones de almacenamiento y leyenda de símbolos.....	3
3. Finalidad del producto/uso previsto	5
4. Limitaciones de uso del producto	5
5. Antes de empezar	6
5.A. Preparación de muestras de sangre completa	6
5.B. Preparación del Maxwell [®] CSC Blood DNA Cartridge	7
6. Ejecución del instrumento	9
7. Después de la purificación	11
8. Evaluación del rendimiento analítico	11
8.A. Cantidad, calidad y amplificabilidad del ADN.....	11
8.B. Reproducibilidad.....	14
8.C. Sustancias de interferencias (inhibición)	15
8.D. Contaminación cruzada.....	15
9. Evaluación del rendimiento clínico	16
9.A. Amplificabilidad del ADN	16
9.B. Reproducibilidad.....	17
9.C. Contaminación cruzada.....	17
10. Resolución de problemas	18
11. Bibliografía	19
12. Productos relacionados	19
13. Resumen de las modificaciones	19

El Maxwell® CSC Blood DNA Kit solamente está disponible en algunos países.

1. Descripción

El Maxwell® CSC Blood DNA Kit^(a,b) se utiliza junto con los Maxwell® Instruments especificados en la tabla 1 para proporcionar un método sencillo de purificación eficaz y automatizada de ADN genómico (ADNg) a partir de muestras de sangre humana. Los Maxwell® CSC Instruments están diseñados para utilizarse con cartuchos de reactivos predispensados y reactivos adicionales suministrados en el kit con métodos de purificación preprogramados, para una máxima sencillez y comodidad. Los Maxwell® CSC Instruments pueden procesar desde una hasta el número máximo de muestras permitidas en aproximadamente 40 minutos, y el ADN purificado puede usarse directamente en diversas aplicaciones posteriores, por ejemplo, PCR.

Tabla 1. Instrumentos compatibles.

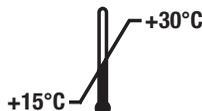
Instrumento	Cat. #	Manual técnico
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Principio del método: El Maxwell® CSC Blood DNA Kit purifica el ácido nucleico mediante partículas paramagnéticas que proporcionan una fase sólida móvil para optimizar la recogida de muestras, el lavado y la purificación del ADNg. Los Maxwell® CSC Instruments manejan las partículas usando métodos magnéticos que adhieren el ADNg eficazmente a las partículas paramagnéticas del primer pocillo de un cartucho precargado, y mueven la muestra por los pocillos del cartucho. Este enfoque de captura magnética evita problemas frecuentes, como, por ejemplo, la obturación de las puntas o la transferencia parcial de reactivos, que dan lugar a un proceso de purificación poco adecuado en otros sistemas automatizados de uso frecuente.

2. Componentes del producto, condiciones de almacenamiento y leyenda de símbolos

PRODUCTO	TAMAÑO	CAT.#
Maxwell® CSC Blood DNA Kit	48 preps	AS1321

Para uso en diagnóstico in vitro. Solamente para uso profesional. Válido para 48 aislamientos automatizados de muestras de sangre completa de 300 µl. Los Maxwell® CSC Cartridges son de un solo uso.



Incluye:

- 2 × 1 ml Solución de proteinasa K (PK)
- 20 ml Tampón lítico
- 48 Maxwell® CSC Blood Cartridges
- 50 CSC/RSC Plungers
- 50 Tubos de elución (0,5 ml)
- 20 ml Tampón de elución

Condiciones de almacenamiento: Almacene el Maxwell® CSC Blood DNA Kit entre +15 y +30 °C.

 **Información de seguridad:** Los cartuchos contienen etanol e isopropanol. Estas sustancias deben considerarse inflamables, dañinas e irritantes. El tampón lítico contiene clorhidrato de guanidina y urea. Estas sustancias deben considerarse tóxicas, dañinas e irritantes. Consulte la ficha técnica de seguridad (SDS) para obtener información de seguridad detallada.

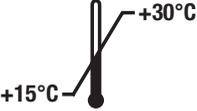
 Los componentes del Maxwell® CSC Blood DNA Kit están diseñados para su uso con sustancias potencialmente infecciosas. Lleve un equipo de protección personal adecuado (p. ej., guantes y gafas de seguridad) cuando manipule sustancias infecciosas. Siga las directrices institucionales de manipulación y eliminación de todas las sustancias infecciosas utilizadas en el sistema.

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

Información adicional: Los componentes del Maxwell® CSC Blood DNA Kit son aptos para el uso conjunto y se han sometido a las pruebas de control de calidad pertinentes. No se recomienda mezclar componentes de kits distintos. Utilice únicamente los componentes proporcionados en el kit. No utilice los cartuchos si el sellado no está intacto al recibirlo.

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

Leyenda de símbolos

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

3. Finalidad del producto/uso previsto

El Maxwell® CSC Blood DNA Kit está diseñado para utilizarse junto con los Maxwell® CSC Instruments y el método de purificación Maxwell® CSC Blood DNA, como producto sanitario para diagnóstico in vitro (IVD) para realizar un aislamiento automatizado del ADN genómico a partir de muestras de sangre completa humana. El ADN purificado es adecuado para el uso en análisis de diagnóstico in vitro basado en amplificación.

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

Con el Maxwell® CSC Blood DNA Kit pueden utilizarse muestras de sangre completa contenidas en tubos de muestras sanguíneas que incluyan anticoagulantes, como EDTA, heparina o citrato de sodio. La tabla de abajo muestra el tiempo aceptable para el almacenamiento de las muestras en distintas condiciones antes de usarlas en el Maxwell® CSC Blood DNA Kit. El Maxwell® CSC Blood DNA Kit no está diseñado para usarse con muestras recogidas en otros tipos de tubos de muestras sanguíneas o almacenadas de forma distinta a las condiciones mencionadas abajo.

Temperatura de almacenamiento de las muestras	Tiempo de almacenamiento antes de la purificación
15–30 °C	Hasta 72 horas
2–10 °C	Hasta 7 días
–80 °C o inferior	Indefinidamente

El Maxwell® CSC Blood DNA Kit está diseñado solamente para uso profesional. Los resultados diagnósticos obtenidos mediante la purificación del ADN genómico con este sistema deberán interpretarse junto con otros datos clínicos o de laboratorio.

4. Limitaciones de uso del producto

El Maxwell® CSC Blood DNA Kit no está diseñado para usarse con muestras de tejido o de fluidos corporales que no sean sangre completa humana, ni con muestras de sangre completa humana coagulada.

El Maxwell® CSC Blood DNA Kit no está diseñado para su uso con muestras no humanas, incluidas las muestras de bacterias o virus, ni para la purificación de ARN.

Se ha evaluado el rendimiento del Maxwell® CSC Blood DNA Kit mediante el aislamiento del ADN de muestras de sangre completa de 50–300 µl con un recuento leucocitario de entre 4×10^6 y 10×10^6 leucocitos/ml.

Se ha evaluado el rendimiento del Maxwell® CSC Blood DNA Kit para analizar su compatibilidad con los siguientes factores inhibidores potenciales para la amplificación del ADN genómico: hemo, alcohol, IgG y guanidina. No se han evaluado otros compuestos.

El usuario es responsable de establecer las características de rendimiento necesarias para las aplicaciones diagnósticas posteriores. Deben incluirse los controles apropiados en cualquier aplicación diagnóstica posterior que utilice ADN genómico purificado mediante el Maxwell® CSC Blood DNA Kit.

5. Antes de empezar

Materiales que ha de aportar el usuario

- Vórtex de mesa
- Pipeteadores y puntas de pipeta para transferir muestras a cartuchos de reactivos precargados
- Tubos de 1,5–2,0 ml para incubar las muestras (por ejemplo, Microtubes, 1,5 ml [Cat.# V1231])
- Bloque de calefacción ajustado a 56 °C
- **Opcional:** mezclador de tubos giratorio para muestras de sangre líquida

5.A. Preparación de muestras de sangre completa

Capacidad de procesamiento de muestras de sangre completa

El rendimiento total del ADN genómico de muestras de sangre completa depende del volumen de las muestras y del número de leucocitos/ml. Cada cartucho suministrado en el Maxwell[®] CSC Blood DNA Kit está diseñado para purificar el ADN genómico de 50–300 µl de sangre completa con un recuento leucocitario de entre 4×10^6 y 10×10^6 leucocitos/ml de sangre completa (valores para un adulto normal sano; 1). Se recomienda realizar un recuento leucocitario de cada muestra antes de purificar el ADN para garantizar que la muestra esté dentro de este rango. Las muestras fuera de este rango pueden arrojar resultados no óptimos.

Nota: Este kit se ha probado con muestras de sangre completa humana recogida en tubos de EDTA, citrato de sodio o heparina. No puede garantizarse el rendimiento de los productos químicos con otros tipos de tubos de muestras sanguíneas. Las muestras de sangre pueden estar frescas (almacenadas a 15–30 °C durante un máximo de 72 horas), refrigeradas (almacenadas a 2–10 °C durante un máximo de siete días) o congeladas (almacenadas a –80 °C o inferior) antes de purificar el ADN. Las muestras congeladas deben descongelarse antes de continuar. Todas las muestras de sangre deben mezclarse completamente antes de su uso.

1. Mezcle todas las muestras de sangre durante al menos 5 minutos a 15–30 °C.
2. Prepare y etiquete los tubos de incubación que se introducirán en el bloque de calefacción ajustado a 56 °C.
3. Añada 30 µl de Proteinase K (PK) Solution a cada tubo de incubación.
4. Añada sangre líquida (entre 50 µl y 300 µl) a cada tubo de incubación. Procure evitar la inclusión de coágulos (si los hay) al transferir sangre al tubo de incubación. El sistema no está diseñado para usarse con muestras de sangre coagulada. Cambie las puntas cada vez que transfiera muestras de sangre para evitar la contaminación cruzada.
5. Añada 300 µl de tampón lítico a cada tubo de incubación. Cambie las puntas cada vez que transfiera tampón lítico para evitar la contaminación cruzada.
6. Agite con vórtex cada tubo a velocidad máxima durante 10 segundos.
7. Incube cada tubo en el bloque de calefacción (ajustado a 56 °C) durante 20 minutos. Durante esta incubación, prepare los cartuchos como se describe en la sección 5.B.

8. Inspeccione todos los lisados después de la incubación. Después del tratamiento con proteinasa K, el color de la muestra cambiará de rojo a marrón verdoso. Si el color de las muestras no cambia después del tratamiento con proteinasa K, el tratamiento habrá sido ineficaz y afectará el rendimiento y la pureza del ADN tras la purificación. No siga procesando las muestras si no se observa ningún cambio de color al final del período de incubación de la proteinasa K.
9. Transfiera cada muestra de lisado de sangre desde el tubo de incubación hasta el pocillo n.º 1 de un cartucho aparte (el pocillo n.º 1 es el de mayor tamaño del cartucho). Cambie las puntas cada vez que transfiera muestras para evitar la contaminación cruzada.

5.B. Preparación del Maxwell® CSC Blood DNA Cartridge

1. Cambie de guantes antes de manipular los cartuchos, émbolos para CSC/RSC y tubos de elución. Los cartuchos se colocan en las bandejas de plataforma fuera del instrumento y, a continuación, las bandejas de plataforma que contienen los cartuchos y las muestras se transfieren al instrumento para la purificación. Coloque cada cartucho en la bandeja de plataforma con el pocillo n.º 1 (el pocillo de mayor tamaño del cartucho) lo más lejos posible de los tubos de elución (figura 2). Presione hacia abajo el cartucho para encajarlo en su posición. Asegúrese de que los dos extremos del cartucho estén totalmente asentados en la bandeja de plataforma. Tire cuidadosamente del sistema de sellado para retirarlo por completo de la parte superior del cartucho. Asegúrese de haber eliminado toda la cinta de sellado y el adhesivo residual del cartucho.



Precaución: Maneje los cartuchos con cuidado. Los bordes del sistema de sellado podrían estar afilados.

2. Coloque un émbolo en el pocillo n.º 8 de cada cartucho.
3. Coloque un tubo de elución vacío en la posición de tubo de elución de cada cartucho en las bandejas de plataforma.

Nota: Utilice únicamente los tubos de elución suministrados en el Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Otros tubos de elución pueden no ser compatibles con los Maxwell® CSC Instruments y pueden afectar al rendimiento de purificación del ADN.

4. Añada 50–100 µl de tampón de elución en el fondo de cada tubo de elución.

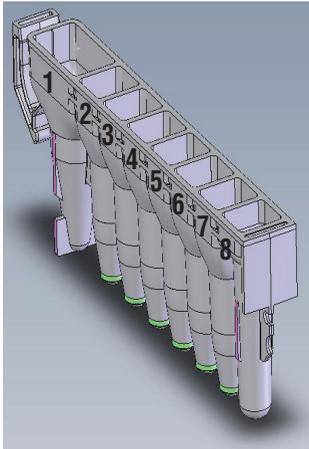
Nota: Utilice únicamente el tampón de elución suministrado en el Maxwell® CSC Blood DNA Kit. El empleo de otros tampones de elución puede afectar al rendimiento de purificación del ADN.

Notas sobre la preparación del Maxwell® CSC Blood DNA Cartridge



Los derramamientos de muestras o reactivos en cualquier parte de la bandeja de plataforma deberán limpiarse con una solución de agua y detergente y, posteriormente, con un spray o paño bactericida seguidos por agua. No utilice lejía en ninguna parte del instrumento.

5.B. Preparación del Maxwell® CSC Blood DNA Cartridge (continuación)



Contenido de los pocillos añadido por el usuario:

1. Muestra de sangre completa lisada
8. Émbolo CSC/RSC

Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge. Se añade la muestra de sangre completa lisada al pocillo n.º 1, y un émbolo al pocillo n.º 8.



Figura 2. Preparación y configuración de la bandeja de plataforma. Se añade el tampón de elución a los tubos de elución de la manera indicada.

6. Ejecución del instrumento

Para obtener información detallada, consulte el Manual Técnico específico de su Maxwell® CSC Instrument. Consulte la tabla 1.

1. Encienda el Maxwell® Instrument y el Tablet PC. Inicie sesión en el Tablet PC e inicie el software de Maxwell® en modo IVD tocando dos veces el icono del escritorio. El instrumento realizará las autocomprobaciones y colocará todas las piezas móviles en la posición de inicio.
2. Seleccione **Iniciar** en la pantalla “Inicio”.
3. Escanee o introduzca el código de barras que figura en la esquina superior derecha de la etiqueta del Maxwell® CSC Blood DNA Kit y pulse **Aceptar** para seleccionar automáticamente el método a ejecutar (figura 3).

Nota: El código de barras del método del Maxwell® CSC Blood DNA Kit se requiere para la purificación de ADN en los Maxwell® CSC Instruments. La etiqueta del kit contiene dos códigos de barras. El código de barras del método se indica en la figura 3. Si no puede escanearse el código de barras, póngase en contacto con Promega Technical Services.



Figura 3. Etiqueta del kit que indica el código de barras que debe escanearse. Escanee el código de barras mostrado en el recuadro rojo de la parte superior derecha de la etiqueta del kit para iniciar una purificación.

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

Nota: Al usar el Maxwell® CSC 48 Instrument, presione el botón **Parte frontal** o **Parte trasera** para seleccionar las posiciones de los cartuchos en cada bandeja de plataforma o anular su selección.

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

6. Ejecución del instrumento (continuación)

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

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

6. Toque el botón **Inicio** para comenzar la extracción. La plataforma se retraerá y se cerrará la puerta.

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



Advertencia: Peligro de aprisionamiento.

7. El Maxwell® Instrument iniciará de forma inmediata la purificación. La pantalla mostrará los pasos realizados y el tiempo aproximado restante en la ejecución.

Notas:

1. Al tocar el botón **Cancelar**, se abandonará la ejecución. Se perderán todas las muestras de una ejecución cancelada.
 2. Si se cancela la ejecución antes de que finalice, puede que se le pida que compruebe si sigue habiendo émbolos cargados en la barra de émbolo. Si hay émbolos presentes en la barra de émbolo, debe ejecutar **Limpiar** cuando se le pida. Si no hay émbolos presentes en la barra de émbolo, puede elegir omitir **Limpiar** cuando se le pida. Se perderán las muestras.
8. Cuando haya terminado la ejecución, la interfaz de usuario mostrará un mensaje de que el método ha finalizado.

Fin de la ejecución

9. Para abrir la puerta, siga las instrucciones en pantalla que aparecen al final del método. Verifique que los émbolos se encuentren en el pocillo n.º 8 del cartucho al final de la ejecución. Si no se han retirado los émbolos de la barra de émbolo, siga las instrucciones del Manual de uso de su Maxwell® Instrument (consulte la tabla 1) para ejecutar el proceso **Limpiar** para intentar descargar los émbolos.

10. Retire las bandejas de plataforma del instrumento inmediatamente después de la ejecución para evitar que se evaporen los eluidos. Retire los tubos de elución que contengan ADN y ciérrelos.

Nota: Tras el procedimiento de purificación automatizada, las bandejas de plataforma podrían estar calientes. Para extraer la bandeja de plataforma del instrumento, sujétela por los laterales.

Asegúrese de que las muestras se retiren del instrumento antes de ejecutar un protocolo de desinfección por UV para evitar daños al ácido nucleico purificado.



11. Retire los cartuchos y los émbolos de las bandejas de plataforma Maxwell®. Deséchelos como residuos peligrosos siguiendo los procedimientos institucionales. No reutilice Maxwell® CSC Cartridges, los émbolos CSC/RSC ni los tubos de elución.

7. Después de la purificación

Compruebe que la concentración y la pureza de la muestra de ADN purificado cumplen los requisitos para el análisis de diagnóstico posterior adecuado antes de usarlas en ese análisis.

8. Evaluación del rendimiento analítico

Se realizó la evaluación del rendimiento analítico del Maxwell® CSC Blood DNA Kit mediante el uso de muestras de sangre en un Maxwell® CSC Instrument. Se comprobó el rendimiento equivalente del Maxwell® CSC Blood DNA Kit con el Maxwell® CSC 48 Instrument como parte del desarrollo de dicho instrumento.

8.A. Cantidad, calidad y amplificabilidad del ADN

Tabla 2. Rendimiento y pureza del ADN de muestras de sangre completa con recuentos leucocitarios diferentes. Se probó una extracción de ADN de ocho réplicas para cada condición mencionada para evaluar la cantidad, calidad y amplificabilidad del ADN. Se extrajo ADN de 300 µl de sangre completa con recuentos leucocitarios entre 4×10^6 y 10×10^6 leucocitos/ml y eluidos en 50 µl. Se midió la absorbancia de ADN purificado a 230 nm, 260 nm, 280 nm y 340 nm. Se determinó la concentración de ADN mediante la absorbancia a 260 nm tras restar la absorbancia del blanco y corregir el ruido del instrumento (absorbancia a 340 nm). Todos los cálculos de absorbancia descritos en esta evaluación de rendimiento se realizaron de esta manera. Se multiplicó la concentración de ADN al eluir su volumen para determinar el rendimiento, y se calcularon las relaciones de A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} para evaluar la calidad del ADN. El Maxwell® CSC Blood DNA Kit produjo cantidades aceptables de ADN ($\geq 3,00$ pg/WBC) para todas las muestras de sangre completa probadas, a pesar del recuento leucocitario. Los rendimientos promedio del ADN purificado fueron $\geq 4,18$ pg/LEUCOCITOS, con relaciones $A_{260}/A_{280} \geq 1,89$ y relaciones $A_{260}/A_{230} \geq 1,68$.

Donante	Promedio total del rendimiento del ADN (µg) (n = 8)	Recuento leucocitario (LEUCOCITOS/ml)	Rendimiento promedio del ADN por célula leucocitaria (pg)	Promedio de relación A_{260}/A_{280}	Promedio de relación A_{260}/A_{230}
1	6,0	$4,5 \times 10^6$	4,45	1,90	1,68
2	8,6	$6,9 \times 10^6$	4,18	1,89	1,91
3	12,4	$9,4 \times 10^6$	4,45	1,91	2,01

8.A. Cantidad, calidad y amplificabilidad del ADN (continuación)

Tabla 3. Rendimiento y pureza del ADN de sangre completa recolectada con anticoagulantes diferentes.

Se evaluó la cantidad y la calidad de los eluidos de ADN purificado preparados a partir de sangre completa recolectada en tubos de extracción de sangre de uso frecuente que contenían EDTA, citrato de sodio o heparina como anticoagulante. Se refrigeraron o congelaron las muestras de sangre y se equilibraron a temperatura ambiente antes de la extracción de ADN. Se purificó el ADN de ocho réplicas de 300 µl para cada anticoagulante y se eluyó en 50 µl. Se calculó la concentración y el rendimiento del ADN y las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} y se muestran en la tabla de abajo. Se observaron rendimientos consistentes y relaciones de pureza en el ADN extraído de todas las muestras mediante el Maxwell® CSC Blood DNA Kit.

Tipo de tubo de muestras de sangre	Promedio total del rendimiento del ADN (µg) (n = 8)	Promedio de concentración de ADN (ng/µl)	Promedio de relación A_{260}/A_{280}	Promedio de relación A_{260}/A_{230}
EDTA	10,97	281,28	1,91	1,94
Citrato de sodio	11,29	283,57	1,93	2,02
Heparina	11,99	307,48	1,94	2,08

Tabla 4. Amplificabilidad del ADN extraído a partir de sangre completa. Se evaluó la amplificabilidad por qPCR del ADN extraído de sangre completa mediante el Maxwell® CSC Blood DNA Kit y el Maxwell® CSC Instrument. Se amplificó cada muestra de ADN purificado mediante secuencia de destino CAPZA3 de 71 bp. Se observaron valores de C_q inferiores a la concentración más baja de la curva estándar de qPCR para todos los tipos de muestras, y estaban dentro del rango lineal del ensayo.

Volumen de sangre completa	Muestra	C_q (ciclos)
50 μ l	1	27,17
	2	26,86
	3	26,95
	4	26,92
	5	27,23
	6	27,12
	7	27,21
	8	26,98
300 μ l	1	26,90
	2	26,78
	3	26,84
	4	26,87
	5	26,66
	6	26,66
	7	26,84
	8	26,75

8.B. Reproducibilidad

Tabla 5. Reproducibilidad en usuarios y días. Se determinó la reproducibilidad de la purificación del ADN en diferentes usuarios y días, con el uso de ocho réplicas de un ejemplar de sangre simple de la siguiente forma:

- Tres usuarios purificaron el ADN de muestras repetidas del mismo ejemplar de sangre completa con el uso del mismo Maxwell[®] CSC Instrument en el mismo día, con una serie de purificación por usuario para identificar la reproducibilidad en diferentes usuarios.
- Un usuario purificó el ADN de muestras repetidas del mismo ejemplar de sangre completa con el uso del mismo Maxwell[®] CSC Instrument, con una serie diaria durante un total de cinco días para determinar la reproducibilidad en diferentes días.

Todas las series de purificación incluyeron ocho réplicas de 300 µl de sangre completa. Se calculó el rendimiento medio, las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} y el porcentaje de variación del coeficiente (% de CV) dentro y entre usuarios y días. Se reprodujeron los rendimientos y las relaciones de rendimiento del ADN extraído mediante el Maxwell[®] CSC Blood DNA Kit en todas las variables probadas.

Variable	Promedio total del rendimiento del ADN (µg)			Promedio de relación A_{260}/A_{280}		Promedio de relación A_{260}/A_{230}	
	(n = 8)	% CV		% CV		% CV	
Usuario	1	11,18	5,7	1,93	0,2	2,00	3,4
	2	10,02	8,8	1,91	0,2	1,92	5,2
	3	12,27	4,2	1,92	0,3	1,92	4,4
Promedio de tres usuarios diferentes	11,16	10,3	1,92	0,4	1,95	4,6	
Día	1	11,88	5,3	1,93	0,4	1,93	5,1
	2	12,27	4,2	1,92	0,3	1,92	4,4
	3	12,78	6,9	1,93	0,3	1,93	3,6
	4	11,31	8,6	1,91	0,3	1,89	4,6
	5	12,92	5,5	1,93	0,3	1,92	3,0
Promedio de cinco días diferentes	12,23	7,7	1,92	0,4	1,92	4,1	

8.C. Sustancias de interferencias (inhibición)

Tabla 6. Inhibición en la amplificación de ADN extraído de sangre completa que contiene diferentes anticoagulantes. Se evaluó la inhibición en la amplificación del ADN extraído de sangre completa mediante el Maxwell® CSC Blood DNA Kit y el Maxwell® CSC Instrument. Se purificó el ADN de muestras de 300 µl de ejemplares de sangre completa recolectados en tubos de EDTA, heparina y citrato de sodio, con ocho réplicas por cada tipo de tubo. Se determinó el efecto de las sustancias de interferencia que pueden estar presentes en el ADN extraído mediante un ADN exógeno de control positivo disponible en el mercado. El ADN exógeno de control positivo se amplificó en presencia y en ausencia del eluido de ADN de cada réplica de sangre completa y los resultados se compararon para determinar si había factores inhibidores en los eluidos de ADN. Se calculó la diferencia en el valor de C_q (ΔC_q) para las dos amplificaciones al restar el valor de C_q de la amplificación del ADN de control del valor de C_q de la amplificación que contenía el ADN extraído con el Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Un valor de ΔC_q inferior a 2 ciclos indicó que cualquier traslado de inhibidores desde los tubos de recolección de sangre, la sangre completa o los reactivos de purificación del ADN tuvo un efecto limitado en la amplificación. Los valores medios de ΔC_q para todos los eluidos de ADN fueron $\leq 1,87$ ciclos, lo que demuestra que el ADN extraído con el Maxwell® CSC Blood DNA Kit no tenía inhibidores detectables de la amplificación del ADN.

	Valor medio de C_q (Ciclos de amplificación; n = 8)	Valor medio de ΔC_q (Ciclos de amplificación; n = 8)
Sin eluido	30,49	NA
EDTA	32,36	1,87
Heparina	31,85	1,36
Citrato de sodio	32,19	1,70

8.D. Contaminación cruzada

Para evaluar si la contaminación cruzada ocurrió durante la extracción de ADN, se ejecutaron muestras de ejemplares de sangre completa masculinos y femeninos en posiciones alternas en la bandeja de cartuchos del Maxwell® CSC Instrument. Se amplificó el ADN purificado mediante un ensayo qPCR de cromosoma específico Y para detectar ADN masculino y verificar que no hubiese ADN de cromosoma Y en los eluidos de las muestras femeninas. Cualquier resultado de concentración inferior a la más baja en la curva estándar designa que no hay ADN contaminante. No se detectó contaminación cruzada cuando se purificó el ADN con el Maxwell® CSC Blood DNA Kit y el Maxwell® CSC Instrument.

9. Evaluación del rendimiento clínico

Un laboratorio clínico externo realizó la evaluación del rendimiento clínico del Maxwell® CSC Blood DNA Kit con el uso de muestras de sangre y del Maxwell® CSC Instrument.

9.A. Amplificabilidad del ADN

Tabla 7. Amplificabilidad del ADN extraído a partir de sangre completa mediante el Maxwell® CSC Blood DNA Kit y el método de referencia del laboratorio. Para evaluar la amplificabilidad del ADN, el mismo se purificó de 16 muestras de sangre diferentes con el uso de 50 µl de volumen de entrada de la muestra y 100 µl de volumen de elución. También se purificó el ADN de las mismas muestras con el uso de 300 µl de volumen de muestra de entrada y 50 µl de volumen de elución para cubrir el rango de volúmenes de entrada y elución para el Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Se purificó el ADN de las mismas muestras mediante el método de purificación de ácido nucleico estándar de laboratorio (método de referencia del laboratorio) para su comparación. El ADN eluido se utilizó como una plantilla en la prueba de diagnóstico molecular del laboratorio clínico para el JAK2 V617F para demostrar que el ADN extraído podría amplificarse mediante un ensayo qPCR. Esta prueba qPCR utiliza dos conjuntos de cebadores, uno específico para el gen de tipo salvaje y otro específico para el mutante V617F. Dado que la finalidad de la evaluación del rendimiento clínico era demostrar que el ADN extraído con el Maxwell® CSC Blood DNA Kit podía amplificarse en una prueba de diagnóstico basada en la amplificación, y no probar la sensibilidad y la especificidad del ensayo de diagnóstico, solo se utilizaron los datos de la qPCR de tipo salvaje para este estudio.

Se compararon el rendimiento y los resultados de qPCR para el ADN obtenido de las mismas muestras con el Maxwell® CSC Blood DNA Kit y el método de referencia del laboratorio. Las muestras extraídas con el Maxwell® CSC Blood DNA Kit utilizaron la combinación del menor volumen de sangre de entrada (50 µl) y el mayor volumen de elución (100 µl) para representar el rendimiento mínimo del Maxwell® CSC Blood DNA Kit, mientras que el método de referencia del laboratorio utilizó sus volúmenes estándar de entrada y elución de 400 µl cada uno. Se determinó la concentración de ADN, medida como ng/µl, para 16 muestras de sangre separadas por absorbancia a 260 nm. El Maxwell® CSC Blood DNA Kit mostró un rendimiento del ADN similar para todas las muestras en comparación con el método de referencia de laboratorio; la relación entre el rendimiento del ADN del Maxwell® CSC Blood DNA Kit y el método de referencia de laboratorio fue inferior a 2. Todas las muestras produjeron un valor de C_q dentro del rango válido entre 10–35.

Número de muestras probadas	Volumen de la muestra de entrada del Maxwell® CSC (µl)	Volumen de elución del Maxwell® CSC (µl)	El Maxwell® CSC cumple los criterios de aceptación (valor de C_q dentro del rango lineal)	Concordancia del Maxwell® CSC con el método de referencia del laboratorio para el rendimiento del ADN
16	50	100	16 de 16	16 de 16
16	300	50	16 de 16	Método de referencia de laboratorio no probado con este volumen de entrada/elución

9.B. Reproducibilidad

Tabla 8. Reproducibilidad a través de probadores. Se purificó el ADN de 8 muestras de sangre completa en 2 probadores por separado con el Maxwell® CSC Instrument y el Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Los eluidos de cada muestra se analizaron por duplicado mediante qPCR para determinar el rendimiento, siguiendo el procedimiento de amplificación JAK2 V617F del laboratorio clínico, utilizando los datos de tipo salvaje del ensayo para este análisis. Se compararon el rendimiento y los resultados de qPCR para el ADN obtenido de las mismas muestras por dos probadores diferentes utilizando el sistema Maxwell® CSC para dos combinaciones diferentes de volúmenes de entrada y elución, con el uso de 8 especímenes diferentes para cada combinación. El ADN de todas las muestras obtenidas por ambos probadores produjo un valor de C_q dentro del rango válido entre 10–35. La concentración de ADN, medida como ng/ μ l de ADN en el eluido, se determinó por absorbancia a 260 nm y la relación entre el rendimiento del ADN obtenido de la misma muestra por el probador 1 y el probador 2 estuvo entre 0,5 y 2,0 para todas las muestras.

Número de muestras por probador	Volumen de la muestra de entrada del Maxwell® CSC (μ l)	Volumen de elución del Maxwell® CSC (μ l)	Valor del Ct dentro del rango lineal del ensayo; 8 muestras por probador	Concordancia entre el probador 1 y el probador 2
8	50	100	16 de 16	8 de 8
8	300	50	16 de 16	8 de 8

9.C. Contaminación cruzada

Se evaluó la contaminación cruzada durante la purificación del ADN en el entorno del usuario previsto para los eluidos preparados a partir de sangre completa con el Maxwell® CSC Blood DNA Kit y el Maxwell® CSC Instrument. Las muestras de sangre y los controles negativos (espacios en blanco de agua) se ejecutaron en posiciones alternas de la bandeja de cartuchos Maxwell® CSC. Se purificó el ADN de 8 muestras de sangre diferentes, con un volumen de muestra de entrada de 300 μ l y un volumen de elución de 50 μ l, y 8 muestras de control negativo.

Se probaron los eluidos para cada muestra de control negativo por duplicado mediante qPCR siguiendo el procedimiento de amplificación JAK2 V617F para la prueba de laboratorio. Se cumplieron todos los criterios de aceptación. No se detectó ADN contaminante en ninguno de los eluidos de control negativo.

10. Resolución de problemas

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

Síntomas

Concentración inferior a lo esperado

Una muestra de sangre completa de 300 µl que contenga entre 4×10^6 y 10×10^6 leucocitos/ml debería producir > 80 ng/µl de ADN genómico en un volumen de elución de 50 µl (medido por absorbancia a 260 nm).

Causas y comentarios

La sangre sometida a múltiples ciclos de congelación-descongelación puede contener ADN degradado. Use muestras recogidas y almacenadas en las condiciones mencionadas en la sección 3.

La muestra de sangre completa contenía un recuento leucocitario bajo. El rendimiento del ADN genómico de muestras de sangre depende del número de leucocitos presentes en la muestra.

No se ha añadido la solución de endopeptidasa K, se ha añadido un volumen insuficiente de solución de endopeptidasa K o bien la endopeptidasa K no se ha mezclado de forma eficaz con la muestra de sangre antes de añadir el tampón lítico. La lisis y el rendimiento dependen de la extracción completa con proteinasa K. Si no se ha añadido proteinasa K en la sección 5.A, paso 3, la muestra de sangre resultante será de color rojo. Las muestras tratadas con proteinasa K se vuelven de color marrón verdoso, lo que puede emplearse como indicador visual de que se ha añadido proteinasa K a la muestra.

La muestra de sangre completa no se mezcló antes del procesamiento. Asegúrese de mezclar las muestras de sangre completa antes del procesamiento para garantizar que los leucocitos estén en suspensión.

Pureza inferior a la esperada

Una muestra de sangre completa de 300 µl que contenga entre 4×10^6 y 10×10^6 leucocitos/ml y que se haya eluido en un volumen de 50 µl debería producir ADNg con una proporción de A_{260}/A_{280} (pureza medida por absorbancia a 260 nm dividida por absorbancia a 280 nm) de 1,7 o superior y una proporción de A_{260}/A_{230} (pureza medida por absorbancia a 260 nm dividida por absorbancia a 230 nm) de 1,5 o superior.

No se ha añadido la solución de endopeptidasa K, se ha añadido un volumen insuficiente de solución de endopeptidasa K o bien la endopeptidasa K no se ha mezclado de forma eficaz con la muestra de sangre antes de añadir el tampón lítico. La lisis y la pureza dependen de la extracción completa con proteinasa K. Si no se añadió proteinasa K en la sección 5.A, paso 3, la muestra de sangre resultante será de color rojo. Las muestras tratadas con proteinasa K se vuelven de color marrón verdoso, lo que puede emplearse como indicador visual de que se añadió proteinasa K.

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

11. Bibliografía

1. Henry, J.B. (2001) *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20.^a ed., W.B. Saunders Company, 509.

12. Productos relacionados

Instrumentos y accesorios

Producto	Tamaño	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	1 unidad	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 unidad	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 unidad	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 unidad	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 unidad	AS8402
Microtube, 1,5 ml	1000/paquete	V1231

*Producto sanitario para diagnóstico in vitro. Este producto solamente está disponible en algunos países.

Maxwell® CSC Reagent Kits

Visite www.promega.com para obtener una lista de los kits de purificación Maxwell® CSC disponibles.

13. Resumen de las modificaciones

Se han realizado las siguientes modificaciones a la revisión 10/22 de este documento:

1. Se ha cambiado el nombre de la sección 3 a “Finalidad del producto/uso previsto”.
2. Se han añadido las secciones 8 y 9 y se han reenumerado las secciones posteriores.
3. Se ha actualizado de conformidad con el Reglamento (UE) 2017/746 en productos sanitarios para diagnóstico in vitro.

^(a)N.º de patente de EE. UU.: 6,855,499 y otras patentes.

^(b)N.º de patente de EE. UU.: 7,329,488 y N.º de patente de Corea: 10-0483684.

© 2012–2022 Promega Corporation. Todos los derechos reservados.

Maxwell es una marca registrada de Promega Corporation.

Estos productos podrían estar protegidos mediante patentes emitidas o pendientes, o podrían tener algunas limitaciones. Para obtener más información, visite nuestro sitio web.

Todos los precios y especificaciones de este manual están sujetos a cambios sin previo aviso.

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