



MANUAL TÉCNICO

Maxwell[®] CSC DNA FFPE Kit

Instrucciones de uso del producto
AS1350

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



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Alemania



INSTRUCCIONES DE
USO DEL PRODUCTO
AS1350



Revisión 10/22
TM395

Maxwell[®] CSC DNA FFPE Kit

Toda la documentación técnica está disponible en: www.promega.com/protocols/
 Visite el sitio web para verificar que está utilizando la versión más actualizada de este manual técnico.
 Si tiene alguna pregunta sobre el uso de este sistema, póngase en contacto 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 las muestras FFPE	6
5.B. Preparación del Maxwell [®] CSC DNA FFPE Cartridge.....	7
6. Ejecución del instrumento	9
7. Después de la purificación	11
8. Evaluación del rendimiento analítico	11
8.A. Amplificabilidad	11
8.B. Reproducibilidad.....	14
8.C. Inhibición (sustancias intrusivas)	16
8.D. Contaminación cruzada.....	16
9. Evaluación del rendimiento clínico	17
9.A. Amplificabilidad del ADN	17
9.B. Reproducibilidad.....	18
9.C. Contaminación cruzada.....	18
10. Solución de problemas	19
11. Bibliografía	20
12. Productos relacionados	21
13. Resumen de las modificaciones	21

El Maxwell® CSC DNA FFPE Kit solo está disponible en algunos países.

1. Descripción

El Maxwell® CSC DNA FFPE Kit^(a) 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 tejido FFPE (fijado mediante formalina e incrustado en parafina). Los Maxwell® CSC Instruments se han diseñado para usarse con los cartuchos de reactivos predispensados y los 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 alrededor de 45 minutos, y el ADN purificado puede usarse directamente en análisis posteriores basados en la amplificación, como por ejemplo, la PCR.

Tabla 1. Instrumentos compatibles.

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

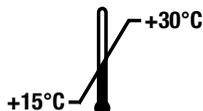
Principio del método: El Maxwell® CSC DNA FFPE Kit purifica el ácido nucleico mediante partículas paramagnéticas, que proporcionan una fase sólida móvil para optimizar la recogida de muestras, el lavado y la purificación del ADNg. Los Maxwell® CSC Instruments manejan las partículas usando métodos magnéticos. Este sistema permite que el ADNg se adhiera eficazmente a las partículas paramagnéticas del primer pocillo de un cartucho precargado y mueve la muestra por los pocillos del cartucho. Este enfoque de captura magnética evita problemas comunes, como 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.

Consideraciones de las muestras: La purificación del ADN de muestras de tejido FFPE puede resultar compleja debido a las características del tejido, como la fibrosidad, la composición lipídica, los niveles de nucleasas y el número de células disponibles en la sección de tejido. Además, la variabilidad en la forma de manipular el tejido antes y durante la fijación, incluida la duración durante la cual se expone el tejido durante el proceso de fijación, influye enormemente en el grado de entrecruzado y fragmentación de ácidos nucleicos en el tejido FFPE. Todos estos atributos pueden influir en la calidad y la cantidad de ácidos nucleicos amplificables que se pueden purificar a partir de las secciones de tejido FFPE. Durante el desarrollo, se evaluó el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit con una variedad de tipos y formatos de tejido FFPE humano (por ejemplo, como secciones de tejido FFPE en portaobjetos frente a secciones gruesas en tubos) para garantizar la purificación óptima del ADN amplificable disponible.

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

PRODUCTO	TAMAÑO	CAT.#
Maxwell® CSC DNA FFPE Kit	48 preps	AS1350

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Solo para uso profesional. Válido para 48 aislamientos automatizados a partir de muestras FFPE. Los Maxwell® FFPE Cartridges son de un solo uso.



Incluye:

- 25 ml Aceite mineral
- 20 ml Tampón lítico
- 2 × 1 ml Endopeptidasa K (PK)
- 100 µl Colorante azul
- 1 ml RNasa A
- 48 Cartuchos Maxwell® FFPE
- 50 Émbolos CSC/RSC
- 50 Tubos de elución (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

Condiciones de almacenamiento: Almacene el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit a una temperatura de entre +15 °C y +30 °C.



Información de seguridad: Los cartuchos contienen etanol e isopropanol. Estas sustancias deben considerarse inflamables, dañinas e irritantes.



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

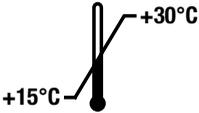


Precaución: Maneje los cartuchos con cuidado, los bordes del sistema de sellado podrían estar afilados.

Información adicional: Los componentes del Maxwell® CSC DNA FFPE 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 <i>in vitro</i>		Representante autorizado
	Se debe almacenar a temperaturas entre +15 °C y +30 °C.		Fabricante
	Precaución		Irritante
	Riesgo para la salud		Válido para "n" pruebas
	Conformidad europea		Advertencia. Riesgos biológicos.
	Advertencia. Peligro de aprisionamiento.		Número de catálogo
	Código de lote		No reutilizar

3. Finalidad del producto/uso previsto

El Maxwell® CSC DNA FFPE Kit está diseñado para usarse, junto con los Maxwell® CSC Instruments y el método de purificación del Maxwell® CSC DNA FFPE, como un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* (IVD) para realizar un aislamiento automatizado del ADN a partir de muestras de tejido FFPE (fijado mediante formalina e incrustado en parafina). El ADN purificado es adecuado para el uso en análisis de diagnóstico *in vitro* basados en la amplificación.

El Maxwell® CSC DNA FFPE 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 DNA FFPE Kit pueden usarse muestras FFPE preparadas mediante formalina tamponada neutra al 10 %.

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

4. Limitaciones de uso del producto

El Maxwell® CSC DNA FFPE Kit se ha diseñado para usarse solo con muestras de tejido FFPE. No está diseñado para usarse con muestras de tejido no FFPE, por ejemplo, muestras de tejido frescas o congeladas. El Maxwell® CSC DNA FFPE Kit no está diseñado para su uso con otros tipos de muestras, incluidas las muestras no humanas, ni para la purificación de ARN.

El Maxwell® CSC DNA FFPE Kit no se ha diseñado para usarse con muestras de tejido preparadas con fijadores distintos a la formalina tamponada neutra al 10 %.

Se ha evaluado el rendimiento del Maxwell® CSC ADN FFPE Kit mediante el aislamiento del ADN de muestras de tejido FFPE de tamaños comprendidos entre 0,02 mm–2,0 mm³.

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 purificado mediante el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit.

5. Antes de empezar

Materiales que ha de aportar el usuario

- Microcentrífuga.
- Pipeteadores y puntas de pipeta para preprocesar y transferir muestras a cartuchos de reactivos precargados.
- Tubos de 1,5 ml–2,0 ml para incubar las muestras (por ejemplo, microtubos, 1,5 ml [Cat.# V1231]).
- Bloques calefactados ajustados a 56 °C y 80 °C. (**Nota:** Hacen falta bloques calefactados a 56 °C y 70 °C si se realiza la incubación nocturna opcional).
- Muestras FFPE con un volumen de tejido total de hasta 2,0 mm³ (**Nota:** Las muestras deben almacenarse a temperatura ambiente [15–30 °C]).
- Cuchillas (**Nota:** Tenga cuidado al utilizar las cuchillas para raspar la muestra del portaobjetos).



5.A. Preparación de las muestras FFPE

Preprocesamiento de las muestras de sección

1. Coloque la sección en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Si utiliza secciones de tejido montadas en un portaobjetos, raspe la sección del portaobjetos con una cuchilla limpia.
2. Añada 300 µl de aceite mineral a los tubos de muestras. Mezcle en vórtex durante 10 segundos.
3. Caliente las muestras a 80 °C durante 2 minutos. Deje las muestras a temperatura ambiente mientras prepara la Master Mix.
4. Prepare una Master Mix de tampón lítico, endopeptidasa K y colorante azul como se muestra a continuación.

Reactivo	Cantidad/reacción	Reacciones (número de ejecuciones + 1)	Total
Tampón lítico	224 µl	n + 1	224 × (n + 1) µl
Endopeptidasa K	25 µl	n + 1	25 × (n + 1) µl
Colorante azul	1 µl	n + 1	1 × (n + 1) µl

5. Añada 250 µl de Master Mix a cada tubo de muestras y mezcle en vórtex durante 5 segundos.
6. Centrifugue los tubos a 10 000 × g durante 20 segundos para separar las capas. Si hay un sedimento en la capa acuosa (capa inferior, de color azul), mezcle suavemente la fase acuosa con una pipeta.
7. Transfiera los tubos de muestras al bloque calefactado a 56 °C e incúbelos durante 30 minutos.

8. Elija uno de los siguientes periodos y temperaturas:
 - a. **Método estándar:** Transfiera los tubos de muestras al bloque calefactado a 80 °C e incúbelos durante 4 horas.
 - b. **Método opcional:** Incube la muestra por la noche a 70 °C durante 14–18 horas.

Nota: En el caso de volúmenes menores de entrada de muestras (menos de 0,1 mm³), es posible que la incubación nocturna opcional a 70 °C no sea óptima. Use el método estándar de 4 horas a 80 °C si la incubación nocturna no consigue purificar la suficiente concentración de ADN para muestras con menor volumen de entrada.
9. Lleve los tubos de muestras a la mesa y deje enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos.
10. Añada 10 µl de ARNasa A a la fase acuosa azul de cada tubo de muestras. Mezcle mediante pipeteado.
11. Incube los tubos de muestras a temperatura ambiente (15–30 °C) durante 5 minutos. Durante esta incubación, prepare los cartuchos como se describe en la sección 5.B.
12. Centrifúgelos a velocidad máxima en una microcentrífuga durante 5 minutos.
13. Transfiera inmediatamente la fase acuosa azul que contiene el ADN al pocillo n.º 1 del cartucho Maxwell® CSC DNA FFPE.

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

1. Cambie de guantes antes de manipular Maxwell® FFPE Cartridges, los émbolos CSC/RSC o los tubos de elución. Los cartuchos se colocan en las bandejas de plataforma fuera del instrumento y 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 sitio. 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 DNA FFPE Kit. Otros tubos de elución pueden no ser compatibles con los Maxwell® CSC Instruments y afectar al rendimiento de purificación del ADN.

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

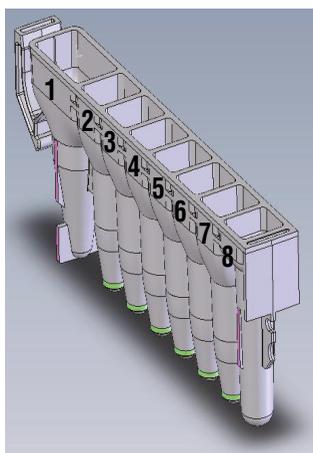
4. Añada 50 µl de Nuclease-Free Water en el fondo de cada tubo de elución.

Nota: Utilice únicamente el Nuclease-Free Water suministrada en el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. El empleo de otros tampones de elución puede afectar a la purificación del ADN.

Notas sobre la preparación del Maxwell® CSC DNA FFPE 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.



Contenido de los pocillos añadido por el usuario:

1. Muestra preprocesada
8. Émbolo CSC/RSC

Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge. Se añade lo siguiente a los pocillos: la muestra FFPE preprocesada, 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 Nuclease-Free Water a los tubos de elución de la manera indicada.

6. Ejecución del instrumento

El Maxwell® CSC DNA FFPE Method para el Maxwell® CSC Instrument puede descargarse del sitio web de Promega: www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-cscsoftware-firmware-methods/. El Maxwell® CSC DNA FFPE Method para el Maxwell® CSC 48 Instrument puede descargarse del sitio web de Promega:

www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-csc-48-methods/

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 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 ADN FFPE Kit y pulse **Aceptar** para seleccionar automáticamente el método para ejecutar (figura 3).

Nota: El código de barras del método del Maxwell® CSC DNA FFPE 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, en la parte superior derecha de la etiqueta del kit para ejecutar una purificación.

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

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.

6. Ejecución del instrumento (continuación)

- 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.

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.

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

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



Advertencia: Peligro de aprisionamiento.

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

Notas:

- Al tocar el botón **Cancelar**, se abandonará la ejecución. Se perderán todas las muestras de una ejecución cancelada.
 - Si se cancela la ejecución antes de que finalice, puede que se le pida que compruebe si sigue habiendo émbolos cargados en la barra de émbolo. Si hay émbolos presentes en la barra de émbolo, debe ejecutar **Limpiar** cuando se le pida. Si no hay émbolos presentes en la barra de émbolo, puede elegir omitir **Limpiar** cuando se le pida. Se perderán las muestras.
- 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. Tape y retire los tubos de elución que contienen ADN inmediatamente después de la ejecución para evitar que los eluidos se evaporen. Retire las bandejas de plataforma Maxwell® del instrumento.

Nota: 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. Las muestras de ADN pueden almacenarse durante un máximo de una semana a 4 °C y durante un máximo de un mes a -20 °C.



11. Retire los cartuchos y los émbolos de las bandejas de plataforma y deséchelos como residuos peligrosos siguiendo los procedimientos institucionales. Los cartuchos, los émbolos y los tubos de elución son de un solo uso. No reutilice Maxwell® FFPE Cartridges, los émbolos CSC/RSC ni los tubos de elución.

7. Después de la purificación

Compruebe que el rendimiento de la muestra de ADN purificado cumple los requisitos para el análisis de diagnóstico posterior adecuado antes de usarla en este análisis. Se ha evaluado el rendimiento del kit en función de la purificación del ADN amplificable. Otros medios de cuantificación, incluidas la absorbancia y la fijación de colorante fluorescente, pueden no ser compatibles con la amplificación (1). Las lecturas de absorbancia de las muestras FFPE purificadas pueden sobrestimar el rendimiento; se recomienda utilizar otros métodos para determinarlo (1).

8. Evaluación del rendimiento analítico

El rendimiento analítico del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit se evaluó mediante el uso de muestras de tejido FFPE de humanos en el Maxwell® CSC Instrument. El rendimiento equivalente del Maxwell® CSC ADN FFPE Kit con el Maxwell® CSC 48 Instrument se demostró como parte del desarrollo de ese instrumento.

8.A. Amplificabilidad

Tabla 2. Amplificabilidad del ADN purificado a partir de secciones de tejido FFPE. El ADN se purificó a partir de secciones de tejido FFPE individuales de tamaño típico utilizando el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit con métodos de preprocesamiento estándar y durante la noche. La cantidad de ADN extraído se evaluó mediante PCR en tiempo real teniendo como objetivo la ARNasa P (102 bp) como objetivo de cuantificación. La amplificación del gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT; 164 bp) se midió como un objetivo de gen de una sola copia de mayor tamaño para evaluar la calidad del ADN. Algunos especímenes que no se lograron amplificar se atribuyeron a la mala calidad de los especímenes de entrada, ya que se observó un resultado fallido similar al usar un kit de la competencia para purificar el ADN de los especímenes. Los datos de las muestras que se determinó que eran de mala calidad se excluyeron del análisis. Se muestra la concentración de ADN promedio para cada conjunto de réplicas. Todas las secciones de tejido FFPE produjeron al menos 100 copias/μl de ARNasa P y fueron detectables para TERT cuando se preprocesaron utilizando los métodos estándar y nocturno.

Tabla 2. Amplificabilidad del ADN purificado a partir de secciones de tejido FFPE (continuación).

Tejido	Condiciones de preprocesamiento	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
		Concentración (copias/μl) o detección		Concentración (copias/μl) o detección		Concentración (copias/μl) o detección	
		ARNasa P	TERT	ARNasa P	TERT	ARNasa P	TERT
Mama*	Estándar	439	Detectado				
	Nocturno	273	Detectado				
Colon*	Estándar	1313	Detectado	2277	Detectado		
	Nocturno	983	Detectado	1050	Detectado		
Esófago*	Estándar	366	Detectado	1314	Detectado		
	Nocturno	243	Detectado	755	Detectado		
Hígado*	Estándar	2472	Detectado	475	Detectado		
	Nocturno	2206	Detectado	434	Detectado		
Pulmón	Estándar	2939	Detectado	3006	Detectado	5217	Detectado
	Nocturno	1176	Detectado	1510	Detectado	3230	Detectado
Páncreas	Estándar	570	Detectado	738	Detectado	110	Detectado
	Nocturno	454	Detectado	565	Detectado	114	Detectado
Próstata	Estándar	936	Detectado	1003	Detectado	3064	Detectado
	Nocturno	829	Detectado	634	Detectado	1931	Detectado
Estómago	Estándar	659	Detectado	548	Detectado	404	Detectado
	Nocturno	454	Detectado	245	Detectado	223	Detectado
Vejiga	Estándar	482	Detectado	421	Detectado	296	Detectado
	Nocturno	355	Detectado	331	Detectado	262	Detectado
Intestino Delgado	Estándar	741	Detectado	424	Detectado	1903	Detectado
	Nocturno	441	Detectado	389	Detectado	1070	Detectado
Útero	Estándar	2124	Detectado	3921	Detectado	4081	Detectado
	Nocturno	1556	Detectado	3117	Detectado	2532	Detectado

*Se analizó tejido mamario de una muestra. Se analizaron tejidos de colon, esófago e hígado de dos muestras diferentes. Para todos los demás tipos de tejido, se analizaron tres muestras diferentes. Las celdas sombreadas oscuramente indican muestras no analizadas.

Tabla 3. Reproducibilidad de la amplificación del ADN. Tres usuarios diferentes purificaron ADN de secciones de tejido FFPE de tamaño reducido usando el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. El ADN se purificó a partir de secciones de tejido de colon e hígado de 0,02 mm³ y 0,1 mm³ siguiendo el método de preprocesamiento estándar. La concentración del ADN se determinó mediante qPCR por duplicado utilizando un objetivo de ARNasa P (102 bp), y se calculó la concentración de ADN promedio para cada sección de tejido y cada tipo de tejido para cada usuario. La concentración media de ADN más baja entre todos los usuarios y todos los tejidos para 0,02 mm³ y 0,1 mm³ de tejido fue de 45 copias/μl y 260 copias/μl, respectivamente.

Tejido	ID de usuario	Tamaño de muestra de tejido	Concentración (copias/μl)
Colon	1	0,10 mm ³	332
		0,02 mm ³	108
	2	0,10 mm ³	445
		0,02 mm ³	188
	3	0,10 mm ³	383
		0,02 mm ³	45
Hígado	1	0,10 mm ³	401
		0,02 mm ³	54
	2	0,10 mm ³	307
		0,02 mm ³	73
	3	0,10 mm ³	260
		0,02 mm ³	68

8.B. Reproducibilidad

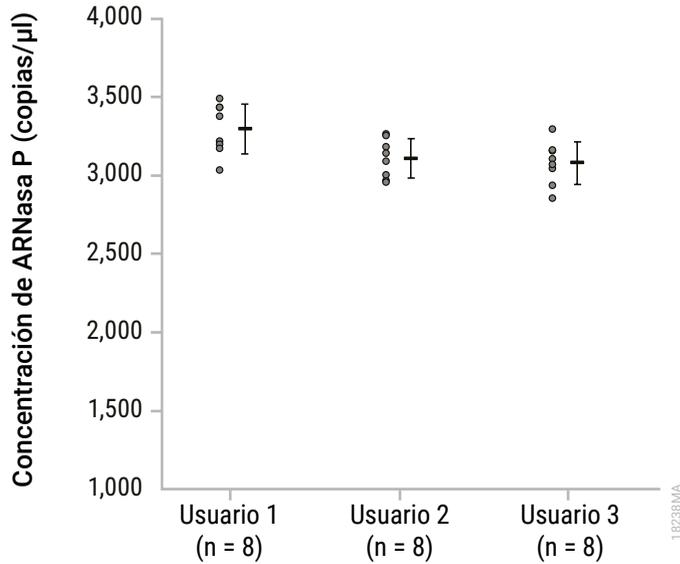


Figura 4. La reproducibilidad de usuario a usuario de la purificación de ADN se caracterizó por tres usuarios que purificaron ADN de secciones en serie de una muestra de tejido mamario FFPE.

Los eluidos se amplificaron mediante qPCR usando un objetivo de RNasa P (102 bp) y se calcularon las concentraciones promedio de ADN y los valores de CV entre y dentro de la ejecución. Los valores de CV en la intraejecución fueron 4,9 % (usuario 1), 4,0 % (usuario 2) y 4,5 % (usuario 3), y el CV en la interejecución entre los tres usuarios fue 5,3 %, lo que demuestra la reproducibilidad de la purificación de ADN por parte de cada usuario y a través de múltiples usuarios. Para cada conjunto de datos, los puntos de la izquierda representan los valores de las muestras individuales, mientras que la media con la desviación estándar se muestra a la derecha.

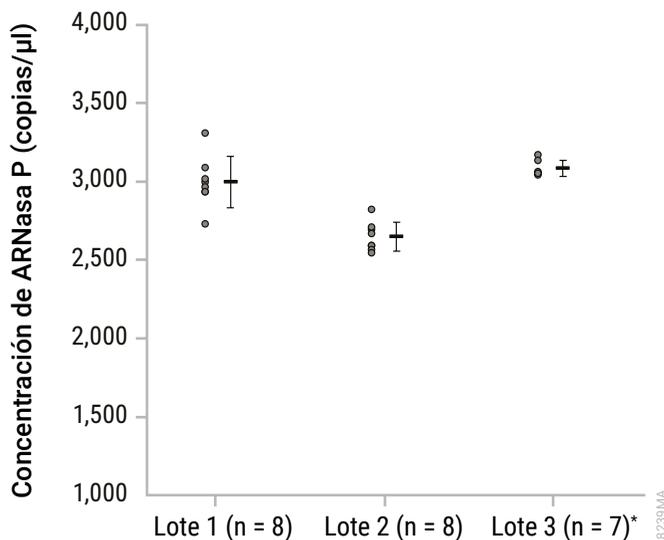


Figura 5. La reproducibilidad de lote a lote de la purificación de ADN se caracterizó por la purificación de ADN por parte de un solo usuario a partir de secciones en serie de una muestra de tejido mamario FFPE utilizando tres lotes del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Los eluidos se amplificaron mediante qPCR usando un objetivo de RNasa P (102 bp) y se calcularon las concentraciones promedio de ADN, demostrando la reproducibilidad de la purificación de ADN utilizando cada lote. Para cada conjunto de datos, los puntos de la izquierda representan los valores de las muestras individuales, mientras que la media con la desviación estándar se muestra a la derecha. *La prueba de valores atípicos de Dixon permitió la exclusión de una réplica en este conjunto como un valor atípico en el umbral de confianza del 95 %. Esta réplica se excluyó del análisis.

8.C. Inhibición (sustancias intrusivas)

Tabla 4. Análisis del ADN purificado para encontrar sustancias intrusivas. El ADN se purificó a partir de una o dos secciones de tejido hepático y de colon FFPE montadas en portaobjetos de tamaño típico utilizando métodos de preprocesamiento estándar y durante la noche con el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Para cada ADN purificado, se ensamblaron dos conjuntos de amplificaciones utilizando 2 µl y 8 µl de entrada de ADN y se calculó la diferencia en los valores de C_q (ΔC_q) entre las dos entradas de ADN. Se esperaría un ΔC_q de 2 para una diferencia de cuatro veces en la entrada de ADN. Todas las condiciones dieron como resultado valores de ΔC_q de 2 ± 1 ciclo, lo que demuestra que cualquier sustancia potencialmente interferente que se copurificó con el ADN no interfirió con la amplificación posterior.

Tipo de tejido FFPE	Condiciones de preprocesamiento	Número de secciones de tejido FFPE	ARNasa P		
			Promedio de 2 µl C_q (Ciclos)	Promedio de 8 µl C_q (Ciclos)	Promedio de ΔC_q (Ciclos)
Colon	Estándar	1 (n = 3)	26,4	24,5	1,9
		2 (n = 3)	25,7	23,6	2,0
	Nocturno	1 (n = 2)	28,3	26,0	2,3
		2 (n = 3)	27,5	25,0	2,4
Hígado	Estándar	1 (n = 3)	25,5	23,5	2,0
		2 (n = 3)	24,5	22,6	1,9
	Nocturno	1 (n = 3)	26,8	24,7	2,1
		2 (n = 3)	25,8	23,7	2,0

8.D. Contaminación cruzada

El ADN se extrajo de ocho secciones replicadas de una muestra de tejido pulmonar FFPE y ocho controles negativos (agua) usando el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Los Maxwell® CSC Cartridges que contenían las muestras FFPE preprocesadas o el control negativo (agua) se procesaron en posiciones alternas de la plataforma en el Maxwell® CSC Instrument. Para determinar si se había producido alguna contaminación cruzada entre las muestras, los eluidos resultantes se analizaron por duplicado mediante qPCR dirigida al gen ARNasa P (102 bp) para detectar cualquier contaminación de ADN en los controles negativos de las muestras FFPE vecinas. Se detectó ADN no contaminante en los controles negativos.

9. Evaluación del rendimiento clínico

Un laboratorio clínico externo evaluó el rendimiento clínico del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit mediante el uso de muestras de tejido humano FFPE y el Maxwell® CSC Instrument.

9.A. Amplificabilidad del ADN

Tabla 5. Amplificabilidad del ADN extraído de tejidos FFPE. El ADN extraído de un total de 21 muestras de tejido FFPE utilizando el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit y Maxwell® CSC Instrument se amplificó en un ensayo qPCR dirigido al gen c-KIT de tipo salvaje utilizando la prueba COLD-PCR C-KIT D816V del laboratorio de pruebas. El ADN extraído de las mismas muestras utilizando el método de purificación de ácido nucleico estándar del laboratorio (Método de Bibliografía de Laboratorio) se amplificó en el mismo ensayo con fines comparativos. Se muestra la diferencia en los valores de C_q (ΔC_q) entre el ADN purificado de la misma muestra de tejido FFPE usando el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit y el método de bibliografía del laboratorio. La amplificabilidad del ADN purificado del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit se correlaciona con el Método de Bibliografía del Laboratorio.

Muestra de tejido FFPE	Promedio de C_q		ΔC_q
	Maxwell® CSC DNA FFPE Kit	Método de Bibliografía del laboratorio	
1	26,57	27,84	-1,27
2	26,65	27,34	-0,68
3	24,16	25,23	-1,07
4	27,05	28,66	-1,62
5	24,64	25,11	-0,47
6	24,54	26,02	-1,48
7	24,25	25,00	-0,75
8	24,59	24,75	-0,16
9	25,07	25,44	-0,37
10	25,78	25,49	0,29
11	24,85	24,80	0,05
12	27,06	25,17	1,89
13	24,40	24,55	-0,15
14	23,51	24,65	-1,14
15	24,25	24,04	0,22
16	27,13	29,22	-2,09
17	27,03	28,70	-1,68
18	29,34	28,76	0,58
19	26,58	28,54	-1,96
20	26,66	27,70	-1,04
21	26,60	28,20	-1,60

9.B. Reproducibilidad

Tabla 6. Reproducibilidad de resultados entre probadores. Para demostrar la constancia de los resultados entre los probadores en el entorno de usuario típico, el ADN extraído de siete muestras de tejido FFPE diferentes por dos probadores separados usando el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit fue amplificado por qPCR dirigido al gen c-KIT de tipo salvaje usando la prueba COLD-PCR C-KIT D816V del laboratorio de pruebas. Los eluidos de la misma muestra de tejido FFPE se analizaron en el mismo ensayo para minimizar el efecto de la variabilidad del ensayo qPCR en los resultados. En la tabla se muestra la diferencia en los valores de C_q (ΔC_q) obtenidos usando ADN purificado de la misma muestra de tejido FFPE por dos probadores diferentes. El ΔC_q entre evaluadores osciló entre 0,12–0,97, lo que demuestra la reproducibilidad del ADN amplificado por múltiples evaluadores.

Muestra de tejido FFPE	Promedio del valor C_q		ΔC_q
	Probador 1	Probador 2	
1	26,57	27,54	0,97
2	26,65	26,53	0,12
3	24,16	24,39	0,23
4	27,05	26,64	0,40
5	24,64	24,29	0,36
6	24,54	24,47	0,07
7	24,25	24,06	0,20

9.C. Contaminación cruzada

Contaminación cruzada que ocurre entre muestras durante la extracción de ADN utilizando el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit en el entorno de usuario típico fue evaluado. La extracción de ADN mediante el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit se realizó con ocho muestras de tejido FFPE diferentes y ocho controles negativos (agua) en la misma ejecución del instrumento. Los Maxwell® CSC Cartridges que contenían muestras de tejido FFPE o controles negativos (agua) se procesaron en posiciones de plataforma adyacentes alternas en el Maxwell® CSC Instrument. Los eluidos resultantes se analizaron por duplicado mediante qPCR dirigida al gen c-KIT de tipo salvaje utilizando la prueba COLD-PCR C-KIT D816V del laboratorio de pruebas para detectar cualquier ADN contaminante en los controles negativos de las muestras FFPE adyacentes. No se detectó ADN contaminante en los ocho controles negativos.

10. Solución de problemas

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

Síntomas

Concentración de ADN en el eluido menor de lo esperado
(una sección FFPE típica debería producir ADN amplificable en función del tamaño y la celularidad del tejido, el estado de la fijación mediante formalina y el manejo del tejido)

Causas y comentarios

Se ha evaluado el rendimiento del kit mediante el aislamiento del ADN de muestras de tejido FFPE de tamaños comprendidos de hasta 2,0 mm³. No se diseñó para volúmenes de muestras superiores a 2,0 mm³. Utilice únicamente secciones que satisfagan la especificación con respecto al tamaño.

El kit está diseñado para usarse con muestras de tejido FFPE. No está concebido para usarse con muestras de tejido no FFPE, por ejemplo, muestras de tejido frescas o congeladas. Se han comprobado los tiempos y las temperaturas de incubación para garantizar un rendimiento óptimo.

El kit no se ha diseñado para usarse con muestras de tejido preparadas con fijadores distintos a la formalina tamponada neutra al 10 %. Consulte al laboratorio de patología o al proveedor para asegurarse de que no se haya empleado un fijador alternativo.

No se puede reclamar por portaobjetos o secciones teñidas. Repita la purificación con un portaobjetos o una sección sin teñir.

Se ha evaluado el rendimiento del kit en función de la purificación del ADN amplificable. Otros medios de cuantificación, incluidas la absorbancia y la fijación de colorante fluorescente, pueden no ser compatibles con la amplificación. Aplique un método de cuantificación de la amplificación para evaluar la purificación.

En el caso de volúmenes menores de entrada de muestras (menos de 0,1 mm³), es posible que la incubación nocturna opcional a 70 °C no sea óptima. Use el desdramiento estándar de 4 horas a 80 °C si la incubación nocturna no consigue purificar la suficiente concentración de ADN para muestras con menor volumen de entrada.

10. Solución de problemas (continuación)

Síntomas

Calidad menor de lo esperado
(el eluido contiene ADN muy fragmentado
o inhibidores de análisis posteriores)

Causas y comentarios

La sección de tejido utilizada para la purificación puede incluir ADN fragmentado debido al estado de la fijación mediante formalina o al manejo del tejido. Si se fragmenta el ADN antes de la extracción y la purificación, el ADN fragmentado se purificará con este kit. Repita el procedimiento con una sección adyacente para evaluar si hay un problema con la sección o con el proceso.

Algunos análisis basados en amplificación son especialmente sensibles a inhibidores. Las comprobaciones del ensayo posterior deberán identificar la presencia de un inhibidor de amplificación en el eluido. El usuario es el responsable de verificar la compatibilidad de este producto con los ensayos posteriores.

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

11. Bibliografía

1. Bonin, S. *et al.* (2010) Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch.* **457**, 309–17.

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 uso en diagnóstico *in vitro*. Este producto solo está disponible en algunos países.

Maxwell® CSC Reagent Kits

Visite www.promega.com para obtener una lista de los kits de purificación de 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 actualizado la sección 3 a “Finalidad del producto/uso previsto”.
2. Se han añadido las secciones 8 y 9.
3. Documento actualizado de conformidad con el Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*.

^(a)Número de patente de EE. UU. 7 329 488 y número de patente de Corea del Sur 100483684.

© 2013–2022 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.