



MANUALE TECNICO

Maxwell® CSC DNA FFPE Kit

Istruzioni per l'uso del prodotto
AS1350

Attenzione: maneggiare le cartucce con attenzione; i bordi del sigillo possono essere taglienti.



ISTRUZIONI PER L'USO
DEL PRODOTTO
AS1350



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germania

Maxwell® CSC DNA FFPE Kit

Tutta la letteratura tecnica è disponibile via Internet all'indirizzo: www.promega.com/protocols/
Visitare il sito web per verificare che la versione in uso del presente manuale tecnico sia quella più aggiornata.
In caso di domande sull'utilizzo del prodotto, contattare i Promega Technical Services
all'indirizzo e-mail: techserv@promega.com

| | |
|---|----|
| 1. Descrizione | 2 |
| 2. Componenti del prodotto, condizioni di conservazione e legenda dei simboli | 3 |
| 3. Finalità prevista/uso previsto del prodotto..... | 5 |
| 4. Limitazioni all'utilizzo del prodotto | 5 |
| 5. Prima di iniziare | 6 |
| 5.A. Preparazione dei campioni FFPE | 6 |
| 5.B. Preparazione della Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge..... | 7 |
| 6. Corsa dello strumento | 9 |
| 7. Post-purificazione | 11 |
| 8. Valutazione delle prestazioni analitiche | 11 |
| 8.A. Amplificabilità..... | 11 |
| 8.B. Riproducibilità | 14 |
| 8.C. Inibizione (sostanze interferenti)..... | 16 |
| 8.D. Contaminazione crociata | 16 |
| 9. Valutazione delle prestazioni cliniche | 17 |
| 9.A. Amplificabilità del DNA | 17 |
| 9.B. Riproducibilità | 18 |
| 9.C. Contaminazione crociata | 18 |
| 10. Risoluzione dei problemi | 19 |
| 11. Bibliografia..... | 20 |
| 12. Prodotti correlati | 20 |
| 13. Riepilogo delle modifiche..... | 21 |

Maxwell® CSC DNA FFPE Kit è disponibile solo in alcuni Paesi.

1. Descrizione

Il Maxwell® CSC DNA FFPE Kit^(a) viene usato in combinazione con i Maxwell® Instrument specificati nella Tabella 1 per fornire un metodo semplice per la purificazione efficiente e automatica del DNA genomico (gDNA) da campioni di tessuto umano FFPE (fissato in formalina e incluso in paraffina). I Maxwell® CSC Instrument sono progettati per essere utilizzati con le cartucce di reagenti predosati e con reagenti aggiuntivi forniti nel kit con metodi di purificazione preprogrammati, massimizzando così la semplicità e la facilità d'uso. I Maxwell® CSC Instrument possono processare da uno al numero massimo di campioni consentito in circa 45 minuti; il DNA purificato può essere usato direttamente in test a valle basati sull'amplificazione, come PCR.

Tabella 1. Strumenti supportati.

| Strumento | Cat. # | Manuale tecnico |
|-----------------|--------|-----------------|
| Maxwell® CSC | AS6000 | TM457 |
| Maxwell® CSC 48 | AS8000 | TM623 |

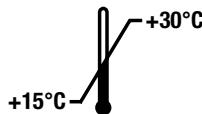
Principio del metodo: Maxwell® CSC DNA FFPE Kit purifica l'acido nucleico utilizzando particelle paramagnetiche, che forniscono una fase solida mobile per ottimizzare la cattura dei campioni, il lavaggio e la purificazione del gDNA. I Maxwell® CSC Instrument sono strumenti per la gestione delle particelle magnetiche. Il sistema consente un legame efficiente del gDNA alle particelle paramagnetiche nella prima camera di una cartuccia preriempita e sposta il campione attraverso le camere della cartuccia. Questo approccio alla cattura magnetica evita problemi frequenti quali puntali coagulati o trasferimenti di reagente parziali, che con altri sistemi automatizzati comunemente usati portano ad un'elaborazione della purificazione non ottimale.

Considerazioni sul campione: la purificazione del DNA da campioni di tessuto FFPE può essere difficile a causa delle caratteristiche del tessuto come la fibrosità, la composizione lipidica, i livelli di nucleasi e il numero di cellule disponibili nella sezione di tessuto. Inoltre, la variabilità nel modo in cui il tessuto viene trattato prima e durante il fissaggio, compresa la durata dell'esposizione del tessuto alla formalina durante il processo di fissaggio del tessuto, influenza notevolmente il grado di crosslinking e frammentazione degli acidi nucleici nel tessuto FFPE. Tutti questi attributi possono influenzare la qualità e la quantità di acidi nucleici amplificabili che possono essere purificati dalle sezioni di tessuto FFPE. Durante lo sviluppo, Maxwell® CSC DNA FFPE Kit è stato valutato con una varietà di tipi e formati di tessuto umano FFPE (p. es., sezioni di tessuto FFPE su vetrini rispetto a riccioli) per garantire una purificazione ottimale del DNA amplificabile disponibile.

2. Componenti del prodotto, condizioni di conservazione e legenda dei simboli

| PRODOTTO | QUANTITÀ | CAT.# |
|----------------------------------|----------------|---------------|
| Maxwell® CSC DNA FFPE Kit | 48 prep | AS1350 |

Per uso diagnostico in vitro. Esclusivamente ad uso professionale. Sufficiente per 48 isolamenti automatici di campioni FFPE. Le Maxwell® FFPE Cartridges sono esclusivamente mono-uso.



Include:

- 25 ml Olio minerale
- 20 ml Tampone di lisi
- 2 × 1 ml Proteinasi K (PK)
- 100 µl Colorante blu
- 1 ml RNasi A
- 48 Maxwell® FFPE Cartridges
- 50 Stantuffi CSC/RSC
- 50 Provette di eluizione (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

Condizioni di conservazione: conservare Maxwell® CSC DNA FFPE Kit tra +15°C e +30°C.



Informazioni sulla sicurezza: le cartucce contengono etanolo e isopropanolo. Queste sostanze devono essere considerate infiammabili, pericolose e irritanti.



I componenti del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit sono progettati per essere utilizzati con sostanze potenzialmente infettive. Indossare dispositivi di protezione individuale (p. es., guanti e occhiali sicurezza) durante la manipolazione di sostanze potenzialmente infettive. Attenersi alle linee guida della propria struttura per la gestione e lo smaltimento di tutte le sostanze potenzialmente infettive utilizzate con questo sistema.

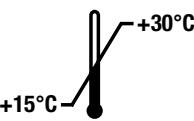


Attenzione: maneggiare le cartucce con attenzione; i bordi del sigillo possono essere taglienti.

Informazioni aggiuntive: i componenti del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit sono qualificati e comprovati per funzionare insieme. Non è consigliato il mescolamento dei componenti di un kit tra lotti di kit differenti. Usare solo i componenti forniti nel kit. Non utilizzare le cartucce se il sigillo sulla cartuccia non è intatto al momento della ricezione.

2. Componenti del prodotto, condizioni di conservazione e legenda dei simboli (continua)

Legenda dei simboli

| Simbolo | Spiegazione | Simbolo | Spiegazione |
|---|--|--|------------------------------------|
| IVD | Dispositivo medico diagnostico in vitro | EC REP | Rappresentante autorizzato |
|  | Conservare a una temperatura da +15°C a +30°C. |  PROMEGA 2800 Woods Hollow Rd. Madison, WI USA | Fabbricante |
|  | Attenzione |  | Irritante |
|  | Rischio per la salute |  | Contenuto sufficiente per "n" test |
| CE | Conformità alle normative europee |  | Avvertenza. Rischio biologico. |
|  | Avvertenza. Pericolo di schiacciamento. | REF | Numero catalogo |
| LOT | Numero lotto |  | Non riutilizzare |

3. Finalità prevista/uso previsto del prodotto

Maxwell® CSC DNA FFPE Kit è destinato all'uso come dispositivo medico-diagnostico in vitro (IVD) per l'isolamento automatico del DNA da campioni di tessuto umano FFPE (fissato in formalina e incluso in paraffina), in combinazione con Maxwell® CSC Instrument e il metodo di purificazione Maxwell® CSC DNA FFPE. Il DNA purificato è adatto per l'impiego in analisi diagnostiche in vitro basate sull'amplificazione.

Maxwell® CSC DNA FFPE Kit è previsto per un impiego ad una temperatura ambiente compresa tra 15°C e 30°C. L'impiego al di fuori di questi valori può comportare risultati non ottimali.

I campioni FFPE preparati con formalina 10% neutra tamponata possono essere impiegati con il Maxwell® CSC DNA FFPE Kit.

Maxwell® CSC DNA FFPE Kit è destinato ad un uso esclusivamente professionale. I risultati diagnostici ottenuti utilizzando il DNA purificato grazie a questo sistema devono essere interpretati congiuntamente ad altri esami clinici o di laboratorio.

4. Limitazioni all'utilizzo del prodotto

Maxwell® CSC DNA FFPE Kit è destinato esclusivamente all'uso con campioni di tessuto FFPE. Non è destinato all'uso con campioni di tessuto diversi dai FFPE, come ad esempio campioni di tessuto freschi o congelati.

Maxwell® CSC DNA FFPE Kit non deve essere utilizzato con altri tipi di campioni, inclusi campioni non umani, o per la purificazione di RNA.

Maxwell® CSC DNA FFPE Kit non deve essere utilizzato con campioni di tessuto che siano stati preparati con fissativi diversi dalla formalina 10% neutra tamponata.

Le prestazioni del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit sono state valutate isolando il DNA da campioni di tessuto FFPE di dimensioni comprese tra 0,02–2,0 mm³.

L'utente è responsabile della definizione delle caratteristiche delle prestazioni necessarie per le applicazioni diagnostiche a valle. Qualsiasi applicazione diagnostica a valle che utilizzi DNA purificato con Maxwell® CSC DNA FFPE Kit deve includere idonei controlli.

5. Prima di iniziare

Fornitura materiali a cura dell'utente

- microcentrifuga
- pipette e puntali per il trasferimento del campione di pre-elaborazione nelle cartucce preriempite di reagente
- provette da 1,5–2,0 ml per l'incubazione dei campioni (p. es., Microtube, 1,5 ml [Cat.# V1231])
- blocchi di riscaldamento a 56°C e a 80°C (**nota:** i blocchi di riscaldamento regolati a 56°C e a 70°C sono necessari per effettuare l'incubazione facoltativa durante la notte)
- campioni FFPE con un volume di tessuto totale fino a 2,0 mm³ (**nota:** i campioni devono essere conservati a temperatura ambiente [15–30°C])
-  • lamette da barba (**nota:** fare attenzione durante l'utilizzo delle lamette per raschiare il campione dal vetrino)

5.A. Preparazione dei campioni FFPE

Pre-elaborazione dei campioni della sezione

1. Porre la sezione in una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml. Se si impiegano sezioni di tessuto montate su vetrino, raschiare la sezione dal vetrino tramite una lametta da barba pulita.
2. Aggiungere 300 µl di olio minerale alle provette del campione. Mescolare tramite agitatore per 10 secondi.
3. Scaldare i campioni a 80°C per 2 minuti. Riporre i campioni a temperatura ambiente durante la preparazione della master mix.
4. Preparare una master mix di tampone di lisi, Proteinasi K e colorante blu come mostrato di sotto.

Reazioni

| Reagente | Quantità/reazione | (numero di corse da eseguire + 1) | Totale |
|-----------------|-------------------|-----------------------------------|------------------|
| Tampone di lisi | 224 µl | n + 1 | 224 × (n + 1) µl |
| Proteinasi K | 25 µl | n + 1 | 25 × (n + 1) µl |
| Colorante blu | 1 µl | n + 1 | 1 × (n + 1) µl |

5. Aggiungere 250 µl di master mix a ciascuna provetta di campione e mescolare tramite agitatore per 5 secondi.
6. Centrifugare a 10.000 × g per 20 secondi per separare gli strati. Se lo strato acquoso (strato blu inferiore) contiene un pellet, mescolare delicatamente la fase acquosa con una pipetta.
7. Trasferire le provette di campione nel blocco di riscaldamento a 56°C e incubare per 30 minuti.

8. Scegliere uno dei seguenti tempi e temperature di incubazione:
 - a. **Metodo standard:** trasferire le provette di campione nel blocco di riscaldamento a 80°C e incubare per 4 ore.
 - b. **Metodo facoltativo:** incubare i campioni durante la notte a 70°C per 14–18 ore.
Nota: per i campioni di volume inferiore (meno di 0,1 mm³), l'incubazione notturna facoltativa a 70°C potrebbe non essere ottimale. Utilizzare il metodo standard di 4 ore a 80°C se l'incubazione notturna non riesce a purificare una concentrazione sufficiente di DNA per i campioni di volume inferiore.
9. Trasferire le provette di campione al banco di prova e lasciar raffreddare il campione a temperatura ambiente per 5 minuti.
10. Aggiungere 10 µl di RNasi A alla fase blu acquosa di ogni provetta campione. Mescolare pipettando.
11. Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (15–30°C). Durante questa incubazione, preparare le cartucce come descritto nella Sezione 5.B.
12. Centrifugare alla massima velocità in una microcentrifuga per 5 minuti.
13. Trasferire immediatamente la fase blu acquosa contenente il DNA nella camera n.1 di una Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge.

5.B. Preparazione della Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge

1. Cambiare guanti prima di maneggiare Maxwell® FFPE Cartridges, CSC/RSC Plungers o Elution Tubes. Le cartucce vengono preparate nell'apposito vassoio esterno allo strumento e i vassoi che contengono le cartucce ed i campioni vengono trasferiti nello strumento per la purificazione. Porre ciascuna cartuccia nel vassoio con la camera n.1 (la camera più ampia nella cartuccia) al massimo della distanza dalle provette di eluizione (Figura 2). Premere sulla cartuccia fino a quando non scatta in posizione. Assicurarsi che ambedue le estremità della cartuccia siano completamente inserite nel vassoio. Staccare delicatamente il sigillo in modo che venga completamente rimosso dalla parte superiore della cartuccia. Assicurarsi che siano stati rimossi dalla cartuccia il nastro sigillante e qualunque residuo di adesivo.



Attenzione: maneggiare le cartucce con attenzione. I bordi del sigillo possono essere taglienti.

2. Posizionare uno stantuffo nella camera n.8 di ciascuna cartuccia.
3. Porre nell'apposita posizione una provetta di eluizione vuota per ciascuna cartuccia del vassoio.
Nota: usare esclusivamente le provette di eluizione a corredo del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Altre provette di eluizione possono non essere compatibili con i Maxwell® CSC Instrument e interferire con la purificazione del DNA.

5.B. Preparazione della Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge (continua)

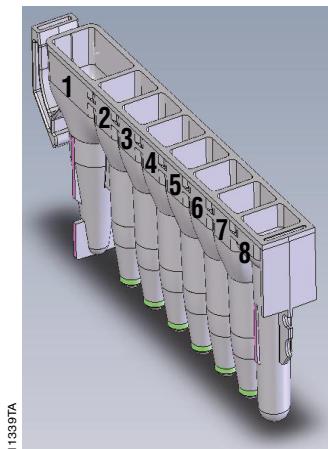
- Aggiungere 50 µl di Nuclease-Free Water sul fondo di ciascuna provetta di eluizione.

Nota: usare esclusivamente Nuclease-Free Water a corredo di il Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. L'impiego di altri tamponi di eluizione può interferire con la purificazione del DNA.

Note sulla preparazione della Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge



Eventuali fuoriuscite di campione o reagente su qualunque parte del vassoio devono essere pulite con una soluzione a base d'acqua e detergente, per applicare poi uno spray battericida, oppure strofinando e lavando nuovamente con acqua. Non usare candeggina su nessuna parte dello strumento.



Componenti aggiuntati dall'utente al contenuto delle camere:

- Campione pre-elaborato
- Stantuffo CSC/RSC



11339TB

Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge. Il campione pre-elaborato FFPE viene aggiunto alla camera n.1; uno stantuffo viene aggiunto alla camera n.8.

6. Corsa dello strumento

Il Maxwell® CSC DNA FFPE Method per il Maxwell® CSC Instrument può essere scaricato dalla pagina Web Promega: www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-cscsoftware-firmware-methods/. Il Maxwell® CSC DNA FFPE Method per il Maxwell® CSC 48 Instrument può essere scaricato dalla pagina Web Promega: www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-csc-48-methods/

1. Accendere Maxwell® Instrument e il Tablet PC. Accedere al tablet PC e avviare il Maxwell® IVD-mode software toccando due volte l'icona sul desktop. Lo strumento procederà a un'auto-verifica e tutte le parti mobili verranno portate nella posizione base.
2. Selezionare **Avvia** nella schermata iniziale.
3. Leggere o digitare il codice a barre nell'angolo in alto a destra dell'etichetta del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit e toccare **OK** per selezionare automaticamente il metodo da eseguire (Figura 3).

Nota: il codice a barre del metodo del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit è necessario per la purificazione del DNA con Maxwell® CSC Instrument. L'etichetta del kit contiene due codici a barre. Il codice a barre del metodo è indicato nella Figura 3. Se il codice a barre non è leggibile, contattare i Promega Technical Services.



Figura 3. Etichetta del kit con l'indicazione del codice a barre da leggere. Leggere il codice a barre, mostrato nel riquadro rosso sulla parte superiore destra dell'etichetta kit reagente, per avviare un ciclo di purificazione.

4. Nella schermata “Impostazione cartuccia” toccare le posizioni della cartuccia per selezionare/deselezionare le posizioni da usare per questo ciclo di estrazione. Immettere eventuali informazioni di tracciabilità richieste per il campione e toccare il pulsante **Procedi** per continuare.

Nota: quando si usa il Maxwell® CSC 48 Instrument, toccare il pulsante **Anteriore** o **Posteriore** per selezionare o deselezionare le posizioni delle cartucce su ciascun vassoio.

6. Corsa dello strumento (continua)

5. Una volta aperto lo sportello, confermare che tutte le voci della lista di controllo estrazione sono state eseguite. Verificare che: i campioni pre-elaborati siano stati aggiunti alla camera n.1 delle cartucce, le cartucce siano caricate sullo strumento, le provette di eluizione stappate siano presenti con tampone di eluizione e gli stantuffi siano nella camera n.8. Trasferire il vassoio contenente le cartucce preparate sulla piattaforma del Maxwell® Instrument.

Inserimento del vassoio Maxwell®: tenere il vassoio dai lati per evitare di spostare le cartucce dal vassoio. Assicurarsi che il vassoio sia posizionato nel Maxwell® Instrument con le provette di eluizione il più vicino possibile allo sportello. Inclinare la parte posteriore del vassoio verso il basso e inserirla dentro lo strumento in modo che la parte posteriore del vassoio sia a contatto con la parte posteriore della piattaforma dello strumento. Premere la parte frontale del vassoio per fissarlo saldamente sulla piattaforma dello strumento. Se si riscontrano difficoltà nel posizionare il vassoio sulla piattaforma, verificare che il vassoio sia orientato correttamente. Accertarsi che il vassoio sia a livello con la piattaforma dello strumento e ben posizionato.

Nota: controllare l'identificativo sui vassoi Maxwell® a 24 posizioni per stabilire se devono essere posizionati nella parte anteriore o posteriore dello strumento.

6. Confermare che tutti i passaggi di pre-elaborazione sono stati eseguiti e toccare **Avvia** per chiudere lo sportello dello strumento e avviare l'elaborazione.

Nota: quando si usa un Maxwell® Instrument a 48 posizioni, se è stato abilitato il Vision System i vassoi saranno letti quando lo sportello si ritrae. Qualsiasi errore nella configurazione dei vassoi (p. es., stantuffi non nella camera n.8, provette di eluizione non presenti e aperte) causerà il ritorno del software alla schermata "Impostazione cartuccia" e le posizioni problematiche saranno contrassegnate con un punto esclamativo racchiuso in un cerchio rosso. Toccare il punto esclamativo per visualizzare la descrizione dell'errore e risolvere tutti gli stati di errore. Toccare di nuovo il pulsante **Avvia** per ripetere la lettura dei vassoi e iniziare il ciclo di estrazione.



Avvertenza: pericolo di schiacciamento.

7. Maxwell® Instrument inizierà immediatamente il ciclo di purificazione. La schermata visualizzerà i passaggi eseguiti e una stima del tempo rimanente per la fine della corsa.

Note:

- a. Toccando il pulsante **Interrompi** il ciclo sarà abbandonato. Tutti i campioni di un ciclo interrotto andranno persi.
 - b. Se il ciclo viene annullato prima che sia completato, potrebbe essere richiesto di controllare se gli stantuffi sono ancora caricati nell'apposita barra. Se nella barra sono presenti degli stantuffi, è necessario eseguire la **Rimozione Stantuffi** quando richiesto. Se non ci sono stantuffi nell'apposita barra, si può scegliere di saltare la **Rimozione Stantuffi** quando richiesto. I campioni andranno persi.
8. Una volta completato il ciclo, l'interfaccia utente visualizzerà un messaggio indicante che il metodo è stato completato.

Fine del ciclo

9. Seguire le istruzioni a schermo al termine del metodo per aprire lo sportello. Verificare che gli stantuffi si trovino nella camera n.8 della cartuccia al termine del ciclo. Se gli stantuffi non vengono rimossi dalla barra, seguire le istruzioni del manuale d'uso del Maxwell® Instrument in uso (vedere la Tabella 1) per eseguire un processo di **Rimozione Stantuffi** per cercare di scaricare gli stantuffi.

10. Tappare e rimuovere le provette di eluizione contenenti DNA subito dopo la corsa per evitare l'evaporazione degli eluiti. Rimuovere il vassoio Maxwell® dallo strumento.

Nota: per rimuovere il vassoio dalla piattaforma dello strumento, tenerlo ai lati. Assicurarsi che i campioni vengano rimossi dallo strumento prima di eseguire un protocollo di igienizzazione UV per evitare di danneggiare l'acido nucleico purificato. I campioni di DNA possono essere conservati per una settimana a 4°C e per un mese a -20°C.

-  11. Rimuovere le cartucce e gli stantuffi dal vassoio e smaltirli come rifiuti pericolosi secondo le procedure in vigore presso la propria struttura. Cartucce, stantuffi e provette di eluizione devono essere utilizzati una sola volta. Non riutilizzare Maxwell® FFPE Cartridges, CSC/RSC Plungers o Elution Tubes.

7. Post-purificazione

Assicurarsi che la resa del campione di DNA purificato sia conforme ai requisiti di ingresso dell'analisi diagnostica a valle prima di impiegarlo in tale analisi. Le prestazioni del kit sono state valutate sulla base della purificazione di DNA amplificabile. Altri mezzi di quantizzazione, quali l'assorbanza o il legame di colorante fluorescente, possono non correlare con l'amplificazione (1). Le letture di assorbanza per campioni FFPE purificati possono sovrastimare la resa; si raccomanda l'utilizzo di altri metodi per la determinazione di quest'ultima (1).

8. Valutazione delle prestazioni analitiche

Le prestazioni analitiche del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit sono state valutate usando campioni di tessuto umano FFPE sul Maxwell® CSC Instrument. La performance equivalente del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit con Maxwell® CSC 48 Instrument è stata provata durante lo sviluppo dello strumento.

8.A. Amplificabilità

Tabella 2. Amplificabilità del DNA purificato da sezioni di tessuto FFPE. Il DNA è stato purificato da singole sezioni di tessuto FFPE di dimensioni tipiche utilizzando Maxwell® CSC DNA FFPE Kit tramite metodi di pre-elaborazione standard e notturni. La quantità di DNA estratto è stata valutata mediante PCR in tempo reale mirata alla quantificazione di RNasi P (102 bp). L'amplificazione del gene della telomerasi trascrittasi inversa (TERT; 164 bp) è stata misurata come target genico di grandi dimensioni e a copia singola al fine di valutare la qualità del DNA. La mancata amplificazione di alcuni campioni è stata ricondotta alla scarsa qualità dei campioni immessi, poiché un risultato simile è stato riscontrato utilizzando un kit realizzato dalla concorrenza per purificare il DNA dai campioni. I dati provenienti dai campioni di scarsa qualità sono stati esclusi dall'analisi. È riportata la concentrazione media di DNA per ciascun set di replicati. Tutte le sezioni di tessuto FFPE hanno prodotto almeno 100 copie per μl di RNasi P e hanno consentito la rilevazione della TERT quando pre-elaborate con metodi standard e notturni.

8.A. Amplificabilità (continua)

Tabella 2. Amplificabilità del DNA purificato da sezioni di tessuto FFPE (continua).

| Tessuto | Condizioni di pre-elaborazione | Campione 1 | | Campione 2 | | Campione 3 | |
|-----------------|--------------------------------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|
| | | RNasi P | TERT | RNasi P | TERT | RNasi P | TERT |
| Mammella* | Standard | 439 | Rilevata | | | | |
| | Incubazione notturna | 273 | Rilevata | | | | |
| Colon* | Standard | 1313 | Rilevata | 2277 | Rilevata | | |
| | Incubazione notturna | 983 | Rilevata | 1050 | Rilevata | | |
| Esofago* | Standard | 366 | Rilevata | 1314 | Rilevata | | |
| | Incubazione notturna | 243 | Rilevata | 755 | Rilevata | | |
| Fegato* | Standard | 2472 | Rilevata | 475 | Rilevata | | |
| | Incubazione notturna | 2206 | Rilevata | 434 | Rilevata | | |
| Polmone | Standard | 2939 | Rilevata | 3006 | Rilevata | 5217 | Rilevata |
| | Incubazione notturna | 1176 | Rilevata | 1510 | Rilevata | 3230 | Rilevata |
| Pancreas | Standard | 570 | Rilevata | 738 | Rilevata | 110 | Rilevata |
| | Incubazione notturna | 454 | Rilevata | 565 | Rilevata | 114 | Rilevata |
| Prostata | Standard | 936 | Rilevata | 1003 | Rilevata | 3064 | Rilevata |
| | Incubazione notturna | 829 | Rilevata | 634 | Rilevata | 1931 | Rilevata |
| Stomaco | Standard | 659 | Rilevata | 548 | Rilevata | 404 | Rilevata |
| | Incubazione notturna | 454 | Rilevata | 245 | Rilevata | 223 | Rilevata |
| Vescica | Standard | 482 | Rilevata | 421 | Rilevata | 296 | Rilevata |
| | Incubazione notturna | 355 | Rilevata | 331 | Rilevata | 262 | Rilevata |
| Intestino tenue | Standard | 741 | Rilevata | 424 | Rilevata | 1903 | Rilevata |
| | Incubazione notturna | 441 | Rilevata | 389 | Rilevata | 1070 | Rilevata |
| Utero | Standard | 2124 | Rilevata | 3921 | Rilevata | 4081 | Rilevata |
| | Incubazione notturna | 1556 | Rilevata | 3117 | Rilevata | 2532 | Rilevata |

*È stato testato tessuto proveniente da mammella di un campione. Sono stati testati tessuti provenienti dal colon, esofago e fegato di due campioni distinti. Per tutti gli altri tipi di tessuto sono stati testati tre campioni distinti. Le celle più scure della tabella indicano i campioni che non sono stati testati.

Tabella 3. Riproducibilità dell'amplificazione del DNA. Tre utenti diversi hanno purificato il DNA da sezioni di tessuto FFPE di dimensioni ridotte utilizzando Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Il DNA è stato purificato da sezioni di tessuto provenienti dal colon e dal fegato di 0,02 mm³ e 0,1 mm³ seguendo il metodo di pre-elaborazione standard. La concentrazione di DNA è stata determinata mediante qPCR in duplicato mirata a RNasi P (102 bp) e la concentrazione media di DNA per ogni sezione di tessuto e per ogni tipo di tessuto è stata calcolata per ogni utente. La concentrazione media più bassa di DNA tra tutti gli utenti e tutti i tessuti per 0,02 mm³ e 0,1 mm³ di tessuto è stata rispettivamente di 45 copie per µl e 260 copie per µl.

| Tessuto | ID utente | Dimensione campione di tessuto | Concentrazione (copie per 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 |
| Fegato | 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. Riproducibilità

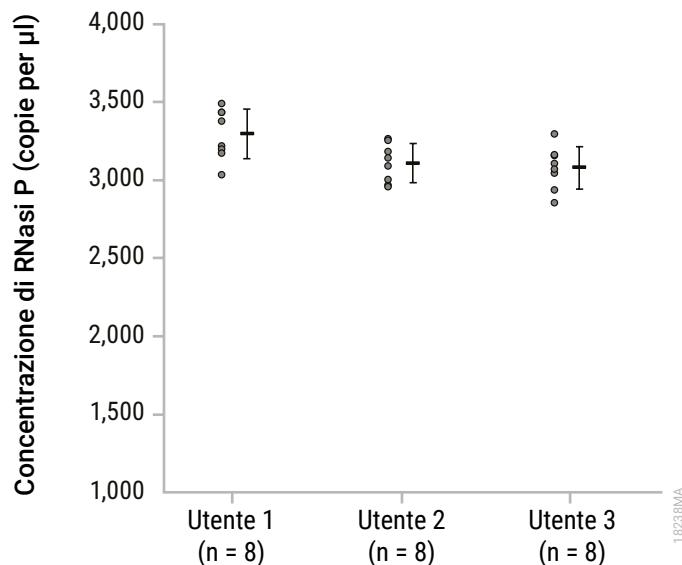


Figura 4. La riproducibilità da utente a utente della purificazione del DNA è stata determinata analizzando i risultati di tre utenti che hanno purificato il DNA da sezioni seriali di un campione di tessuto FFPE proveniente da mammella. Gli eluiti sono stati amplificati mediante qPCR mirata a RNasi P (102 bp) e sono state calcolate le concentrazioni medie di DNA e i valori di CV all'interno di un ciclo e tra più cicli. I valori CV all'interno di un ciclo sono risultati di 4,9% (utente 1), 4,0% (utente 2) e 4,5% (utente 3), mentre i valori CV tra più cicli sono risultati di 5,3% per tutti e tre gli utenti, provando la riproducibilità della purificazione del DNA per ogni utente e per utenti multipli. Per ogni set di dati, i punti sulla sinistra rappresentano i valori dei singoli campioni, mentre la media con la deviazione standard si trova sulla destra.

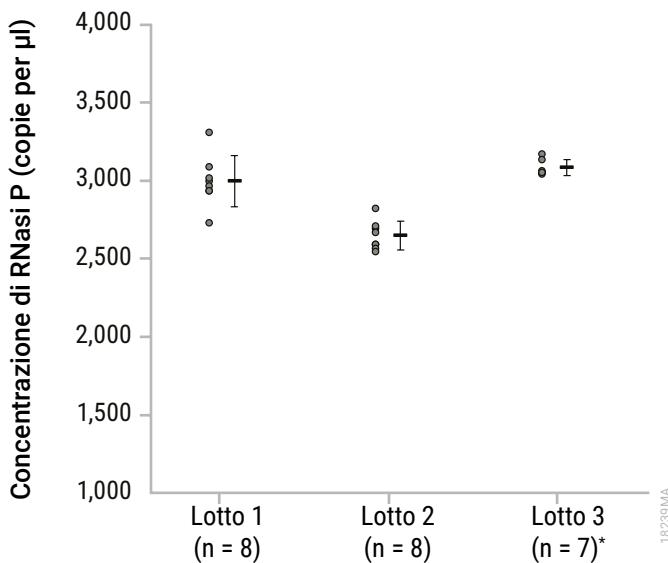


Figura 5. La riproducibilità da lotto a lotto della purificazione del DNA è stata determinata da un singolo utente che ha purificato il DNA da sezioni seriali di un campione di tessuto FFPE proveniente da mammella utilizzando tre lotti del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Gli eluiti sono stati amplificati mediante qPCR mirata a RNasi P (102 bp) e sono state calcolate le concentrazioni medie di DNA, provando la riproducibilità della purificazione del DNA per ciascun lotto. Per ogni set di dati, i punti sulla sinistra rappresentano i valori dei singoli campioni, mentre la media con la deviazione standard si trova sulla destra.
 *Il Dixon's Outlier Test ha permesso di escludere un replicato in questo set come eccezione alla soglia di confidenza del 95%. Questo replicato è stato escluso dall'analisi.

8.C. Inibizione (sostanze interferenti)

Tabella 4. Analisi del DNA purificato alla ricerca di sostanze interferenti. Il DNA è stato purificato da una o due sezioni di tessuto FFPE di dimensioni tipiche provenienti dal colon e dal fegato montate su vetrini, utilizzando metodi di pre-elaborazione standard e notturni con Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Per ciascun DNA purificato sono state realizzate due serie di amplificazioni utilizzando volumi immessi di DNA di 2 µl e 8 µl ed è stata calcolata la differenza nei valori di C_q (ΔC_q) tra i due volumi immessi di DNA. Per una differenza di DNA immesso pari a quattro volte dovrebbe risultare un valore ΔC_q pari a 2. Tutte le condizioni testate hanno dato luogo a valori ΔC_q di 2 ± 1 cicli, dimostrando che qualsiasi sostanza potenzialmente interferente purificata in concomitanza con il DNA non ha interferito con l'amplificazione a valle.

| Tipo di tessuto FFPE | Condizioni di pre-elaborazione | Numero di sezioni di tessuto FFPE | RNasi P | | |
|----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | | | C_q 2 µl medio (cicli) | C_q 8 µl medio (cicli) | ΔC_q medio (cicli) |
| Colon | Standard | 1 (n = 3) | 26,4 | 24,5 | 1,9 |
| | | 2 (n = 3) | 25,7 | 23,6 | 2,0 |
| | Incubazione notturna | 1 (n = 2) | 28,3 | 26,0 | 2,3 |
| | | 2 (n = 3) | 27,5 | 25,0 | 2,4 |
| Fegato | Standard | 1 (n = 3) | 25,5 | 23,5 | 2,0 |
| | | 2 (n = 3) | 24,5 | 22,6 | 1,9 |
| | Incubazione notturna | 1 (n = 3) | 26,8 | 24,7 | 2,1 |
| | | 2 (n = 3) | 25,8 | 23,7 | 2,0 |

8.D. Contaminazione crociata

Il DNA è stato estratto da otto sezioni replicate provenienti da un campione di tessuto FFPE polmonare e otto controlli negativi (acqua) usando il Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Le Maxwell® CSC Cartridges contenenti campioni di tessuto FFPE pre-elaborati o il controllo negativo (acqua) sono state elaborate in posizioni dei vassoi alternate sul Maxwell® CSC Instrument. Per determinare se si fosse verificata una contaminazione crociata tra i campioni, gli eluiti risultanti sono stati analizzati in duplicato mediante qPCR mirata al gene RNasi P (102 bp) per verificare eventuali contaminazioni del DNA nei controlli negativi dai campioni FFPE vicini. Non è stato rilevato alcun DNA contaminante nei controlli negativi.

9. Valutazione delle prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche del Maxwell® CSC DNA FFPE Kit sono state valutate da un laboratorio clinico esterno usando campioni di tessuto umano FFPE e il Maxwell® CSC Instrument.

9.A. Amplificabilità del DNA

Tabella 5. Amplificabilità del DNA estratto da tessuti FFPE. Il DNA estratto da un totale di 21 campioni di tessuto FFPE utilizzando Maxwell® CSC DNA FFPE Kit e Maxwell® CSC Instrument è stato amplificato in un'analisi qPCR mirata al gene c-KIT wild-type utilizzando il test COLD-PCR C-KIT D816V del laboratorio di analisi. Il DNA estratto dagli stessi campioni utilizzando il metodo di purificazione degli acidi nucleici standard del laboratorio (metodo di riferimento del laboratorio) è stato amplificato nella stessa analisi a scopo di confronto. È riportata la differenza dei valori C_q (ΔC_q) tra il DNA purificato dallo stesso campione di tessuto FFPE utilizzando Maxwell® CSC DNA FFPE Kit e il metodo di riferimento del laboratorio. L'amplificabilità del DNA purificato con Maxwell® CSC DNA FFPE Kit è correlata al metodo di riferimento del laboratorio.

| Campione di tessuto FFPE | Maxwell® CSC DNA FFPE Kit | C_q medio | Metodo di riferimento del laboratorio | ΔC_q |
|--------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------------------|--------------|
| 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. Riproducibilità

Tabella 6. Riproducibilità dei risultati tra i tester. Per dimostrare la coerenza dei risultati tra i tester nell'ambiente tipico dell'utente, il DNA estratto da sette diversi campioni di tessuto FFPE da due tester diversi utilizzando Maxwell® CSC DNA FFPE Kit è stato amplificato mediante qPCR mirata al gene c-KIT wild-type utilizzando il test COLD-PCR C-KIT D816V del laboratorio di analisi. Gli eluiti provenienti dallo stesso campione di tessuto FFPE sono stati analizzati nella stessa analisi per ridurre al minimo l'effetto della variabilità dell'analisi qPCR sui risultati. La differenza dei valori C_q (ΔC_q) ottenuti utilizzando DNA purificato dallo stesso campione di tessuto FFPE da due tester diversi è riportata nella tabella. Il ΔC_q tra i tester variava da 0,12–0,97, dimostrando la riproducibilità del DNA amplificato da tester multipli.

| Campione di tessuto FFPE | Valore C_q medio | | ΔC_q |
|--------------------------|--------------------|----------|--------------|
| | Tester 1 | Tester 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. Contaminazione crociata

È stata valutata la contaminazione crociata tra i campioni durante l'estrazione del DNA utilizzando Maxwell® CSC DNA FFPE Kit nel tipico ambiente dell'utente. È stata eseguita l'estrazione del DNA utilizzando Maxwell® CSC DNA FFPE Kit con otto campioni di tessuto FFPE distinti e otto controlli negativi (acqua) nella stessa corsa dello strumento. Le Maxwell® CSC Cartridges contenenti campioni di tessuto FFPE o i controlli negativi (acqua) sono state elaborate in posizioni dei vassoi alternate e adiacenti sul Maxwell® CSC Instrument. Gli eluiti risultanti sono stati analizzati in duplicato mediante qPCR mirata al gene c-KIT wild-type usando il test COLD-PCR C-KIT D816V del laboratorio di analisi per rilevare DNA contaminante nei controlli negativi dai campioni FFPE adiacenti. Non è stato rilevato alcun DNA contaminante negli otto controlli negativi.

10. Risoluzione dei problemi

Per domande non specificamente trattate nel presente manuale, rivolgersi alla filiale o al distributore Promega locale. Le informazioni relative ai contatti sono disponibili all'indirizzo: www.promega.com
E-mail: techserv@promega.com

| Problema | Cause e commenti |
|---|--|
| Concentrazioni di DNA nell'eluito inferiori alle attese (una sezione FFPE tipica deve produrre DNA amplificabile in funzione di: dimensioni e cellularità del tessuto, condizioni di fissaggio in formalina e maneggiamento) | Le prestazioni del kit sono state valutate isolando il DNA da campioni di tessuto FFPE fino a 2,0 mm ³ . Non è stato progettato per volumi di campione superiori a 2,0 mm ³ . Utilizzare solo le sezioni che soddisfano le specifiche delle dimensioni. |
| | Il kit è stato progettato per l'uso con campioni di tessuto FFPE. Non è stato destinato all'uso con campioni di tessuto diversi dai FFPE, come ad esempio campioni di tessuto freschi o congelati. I tempi di incubazione e le temperature sono stati testati per garantire una resa ottimale. |
| | Il kit non è stato progettato per l'uso con campioni di tessuto che siano stati preparati con fissativi diversi dalla formalina 10% neutra tamponata. Controllare con il laboratorio di patologia o con il venditore che non siano stati utilizzati fissativi alternativi. |
| | Nessuna prerogativa è valida per vetrini o sezioni macchiati. Ripetere la purificazione con vetrini o sezioni non macchiati. |
| | Le prestazioni del kit sono state valutate sulla base della purificazione di DNA amplificabile. Altri mezzi di quantizzazione, quali l'assorbanza o il legame di colorante fluorescente, possono non correlare con l'amplificazione. Usare una quantizzazione dell'amplificazione per valutare la purificazione. |
| | Per i campioni di volume inferiore (meno di 0,1 mm ³), l'incubazione notturna facoltativa a 70°C potrebbe non essere ottimale. Utilizzare il decrosslinking standard di 4 ore a 80°C se l'incubazione notturna non riesce a purificare una concentrazione sufficiente di DNA per i campioni di volume inferiore. |

10. Risoluzione dei problemi (continua)

| Problema | Cause e commenti |
|--|---|
| Qualità inferiore alle attese (l'eluito contiene DNA fortemente frammentato o inibitori dell'analisi a valle) | La sezione di tessuto usata per la purificazione può includere DNA frammentato a causa delle condizioni di fissaggio in formalina o del maneggiamento. Se il DNA è frammentato prima della purificazione di estrazione, il kit purificherà DNA frammentato. Ripetere su una sezione adiacente per stabilire se il problema è inerente alla sezione o al processo. |
| | Alcune analisi basate sull'amplificazione sono particolarmente sensibili agli inibitori. I controlli delle analisi a valle dovranno identificare la presenza di un inibitore di amplificazione nell'eluito. È responsabilità dell'utente verificare la compatibilità di questo prodotto con le analisi a valle. |

Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo che ha portato, o potrebbe portare, alla morte o a lesioni gravi di un utente o di un paziente deve essere immediatamente segnalato al fabbricante. Gli utenti con sede nell'Unione Europea devono inoltre segnalare qualsiasi incidente grave all'Autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utente e/o il paziente.

11. Bibliografia

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

12. Prodotti correlati

Strumento e accessori

| Prodotto | Quantità | Cat.# |
|-------------------------------------|-------------|--------|
| Maxwell® CSC Instrument* | 1 cadauno | AS6000 |
| Maxwell® RSC/CSC Deck Tray | 1 cadauno | SP6019 |
| Maxwell® CSC 48 Instrument* | 1 cadauno | AS8000 |
| Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray | 1 cadauno | AS8401 |
| Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray | 1 cadauno | AS8402 |
| Microtube, 1,5 ml | 1.000/conf. | V1231 |

*Per uso diagnostico in vitro. Questo prodotto è disponibile solo in alcuni Paesi.

Maxwell® CSC Reagent Kits

Visitare www.promega.com per l'elenco dei kit di purificazione Maxwell® CSC disponibili.

13. Riepilogo delle modifiche

Sono state apportate le seguenti modifiche alla revisione del 10/22 di questo documento:

1. La Sezione 3 è stata rinominata Finalità prevista/uso previsto del prodotto.
2. Sono state aggiunte le sezioni 8 e 9.
3. Documento aggiornato in conformità al Regolamento (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medici diagnostici in vitro.

^(a)Brevetti USA n. 7.329.488 e brevetto Sud Corea n. 100483684.

© 2013–2022 Promega Corporation. Tutti i diritti riservati.

Maxwell è un marchio registrato di Promega Corporation.

I prodotti possono essere coperti da brevetti già rilasciati o in corso di rilascio o possono essere soggetti a determinate limitazioni. Per ulteriori informazioni visitare il nostro sito Web.

Specifiche e prezzi sono soggetti a modifica senza preavviso.

Le descrizioni dei prodotti sono soggette a modifica. Per informazioni aggiornate sui prodotti Promega rivolgersi ai Promega Technical Services oppure consultare il catalogo Promega online.