

MANUAL TÉCNICO

# Maxwell<sup>®</sup> CSC DNA FFPE Kit

Instruções de utilização do produto  
**AS1350**

**Atenção:** manuseie os cartuchos com cuidado; as extremidades do selo podem ser cortantes.

# Maxwell<sup>®</sup> CSC DNA FFPE Kit

Toda a literatura técnica está disponível na Internet em: [www.promega.com/protocols/](http://www.promega.com/protocols/)  
 Visite o Website para verificar se está a utilizar a versão mais atual deste Manual técnico.  
 Se tiver quaisquer dúvidas sobre a utilização deste sistema, envie um e-mail para o nosso centro de assistência,  
 Promega Technical Services: [techserv@promega.com](mailto:techserv@promega.com)

1. Descrição .....	2
2. Componentes do produto, condições de armazenamento e legenda dos símbolos.....	3
3. Finalidade prevista/Utilização prevista do produto .....	5
4. Limitações de utilização do produto.....	5
5. Antes de começar .....	6
5.A. Preparação de amostras FFPE .....	6
5.B. Preparação dos Maxwell <sup>®</sup> CSC DNA FFPE Cartridge .....	7
6. Execução do instrumento.....	9
7. Pós-purificação .....	11
8. Avaliação do desempenho analítico.....	11
8.A. Amplificabilidade .....	11
8.B. Reprodutibilidade .....	14
8.C. Inibição (Substâncias interferentes).....	16
8.D. Contaminação cruzada .....	16
9. Avaliação do desempenho clínico.....	17
9.A. Amplificabilidade do DNA .....	17
9.B. Reprodutibilidade .....	18
9.C. Contaminação cruzada .....	18
10. Resolução de Problemas .....	19
11. Bibliografia.....	20
12. Produtos Relacionados .....	20
13. Resumo das alterações.....	21

O Maxwell® CSC DNA FFPE Kit está disponível apenas em alguns países.

## 1. Descrição

O Maxwell® CSC DNA FFPE Kit<sup>(a)</sup> é utilizado, em conjunto com o Maxwell® Instruments especificados na Tabela 1 de modo a proporcionar um método fácil para a purificação automática e eficiente de DNA genómico (gDNA) a partir de amostras de tecido FFPE (fixadas em formol e incluídas em parafina). O Maxwell® CSC Instruments são concebidos para serem utilizados com cartuchos de reagentes pré-dispensados e reagentes adicionais fornecidos com o kit com métodos de purificação pré-programados, proporcionando assim uma maior simplicidade e comodidade. Os Maxwell® CSC Instruments permitem processar de uma até ao máximo de amostras permitido em aproximadamente 45 minutos e o DNA purificado pode ser utilizado diretamente em ensaios a jusante baseados na amplificação, tais como a PCR.

**Tabela 1. Instrumentos suportados.**

<b>Instrumento</b>	<b>Cat. #</b>	<b>Manual técnico</b>
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

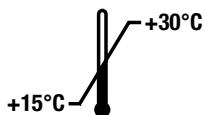
**Princípio do Método:** o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit purifica o ácido nucleico, utilizando partículas paramagnéticas, que fornecem uma fase sólida móvel para otimizar a captura, a lavagem e a purificação de amostras de gDNA. O Maxwell® CSC Instruments são instrumentos de manuseamento de partículas magnéticas. Este sistema permite a ligação eficiente do gDNA às partículas paramagnéticas no primeiro poço de um cartucho pré-cheio e move a amostra ao longo dos poços do cartucho. Esta abordagem à captura magnética evita problemas comuns, como pontas entupidas ou transferências de reagentes parciais, que resultam no processamento subótimo da purificação por outros sistemas automáticos normalmente utilizados.

**Considerações sobre as amostras:** a purificação do DNA a partir de amostras de tecido FFPE pode ser desafiante devido às características do tecido, tais como fibrosidade, composição lipídica, níveis de nuclease e o número de células disponíveis na secção do tecido. Além disso, a variabilidade na forma como o tecido é manuseado antes e durante a fixação, incluindo a duração a que o tecido é exposto à formalina durante o processo de fixação do tecido, influencia fortemente o grau de reticulação e a fragmentação dos ácidos nucleicos no tecido FFPE. Todos estes atributos podem influenciar a qualidade e a quantidade de ácidos nucleicos amplificáveis que podem ser purificados a partir de secções de tecido FFPE. Durante o desenvolvimento, o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit foi avaliado com uma variedade de tipos e formatos de tecido FFPE humano (por exemplo, secções de tecido FFPE em lâminas versus encaracolado) para assegurar uma purificação ideal do DNA amplificável disponível.

## 2. Componentes do produto, condições de armazenamento e legenda dos símbolos

PRODUTO	TAMANHO	CAT.#
Maxwell® CSC DNA FFPE Kit	48 preparações	AS1350

Para utilização em diagnóstico in vitro. Apenas para utilização profissional. Quantidade suficiente para 48 isolamentos automáticos a partir de amostras FFPE. Os Maxwell® FFPE Cartridges destinam-se apenas a uma única utilização.



Inclui:

- 25 ml Óleo mineral
- 20 ml Tampão de lise
- 2 × 1 ml Proteinase K (PK)
- 100 µl Corante azul
- 1 ml RNase A
- 48 Maxwell® FFPE Cartridges
- 50 Êmbolos CSC/RSC
- 50 Tubos de eluição (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

**Condições de armazenamento:** armazene o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit à temperatura ambiente entre +15 °C e +30 °C.



**Informações de segurança:** os cartuchos contêm etanol e isopropanol. Estas substâncias devem ser consideradas como inflamáveis, nocivas e irritantes.



Os componentes do Maxwell® CSC DNA FFPE Kit são concebidos para serem utilizados com substâncias potencialmente infecciosas. Use equipamento de proteção individual adequado (por exemplo, luvas e óculos de proteção) durante o manuseamento de substâncias potencialmente infecciosas. Cumpra as diretrizes institucionais quanto ao manuseamento e à eliminação de substâncias potencialmente infecciosas utilizadas com este sistema.



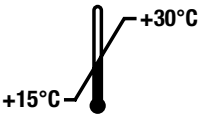













**Atenção:** manuseie os cartuchos com cuidado; as extremidades do selo podem ser cortantes.

**Informações adicionais:** os componentes do Maxwell® CSC DNA FFPE Kit são qualificados e testados de acordo com o controlo de qualidade para trabalharem em conjunto. Não é recomendado misturar componentes de kits com lotes de kits diferentes. Utilize apenas os componentes fornecidos no kit. Não utilize os cartuchos se o selo no cartucho não estiver intacto no momento da receção.

## 2. Componentes do produto, condições de armazenamento e legenda dos símbolos (continuação)

### Legenda dos símbolos

Símbolo	Explicação	Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro		Representante autorizado
	Conserve entre +15 °C a +30 °C.		Fabricante
	Atenção		Irritante
	Risco de saúde		Conteúdo suficiente para "n" testes
	Conformidade Europeia		Aviso. Riscos biológicos.
	Aviso. Perigo de entalamento.		Número de catálogo
	Número de lote		Não reutilizar

### **3. Finalidade prevista/Utilização prevista do produto**

O Maxwell® CSC DNA FFPE Kit destina-se a ser utilizado, em conjunto com o Maxwell® CSC Instruments e com o método de purificação Maxwell® CSC FFPE DNA, como um dispositivo médico (IVD) para diagnóstico in vitro para a realização do isolamento automático de DNA a partir de amostras de tecido FFPE (fixadas em formol e incluídas em parafina). O DNA purificado é adequado para utilização em ensaios de diagnóstico in vitro com base na amplificação.

O Maxwell® CSC DNA FFPE Kit destina-se a ser utilizado a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C. A utilização fora deste intervalo de temperatura pode dar origem a resultados subótimos.

As amostras FFPE preparadas com formol neutro tamponado a 10% podem ser utilizadas com o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit.

O Maxwell® CSC DNA FFPE Kit destina-se exclusivamente a utilização profissional. Os resultados do diagnóstico obtidos através da utilização de DNA purificado com este sistema devem ser interpretados em conjunto com outros dados clínicos ou laboratoriais.

### **4. Limitações de utilização do produto**

O Maxwell® CSC DNA FFPE Kit destina-se apenas a ser utilizado com amostras de tecido FFPE. Não se destina a utilização com amostras de tecido não FFPE, como amostras de tecido frescas ou congeladas. O Maxwell® CSC DNA FFPE Kit não se destina a ser utilizado com outros tipos de amostras, incluindo amostras não humanas nem para a purificação de RNA.

O Maxwell® CSC DNA FFPE Kit não se destina a ser utilizado com amostras de tecido que tenham sido preparadas com fixadores diferentes do formol neutro tamponado a 10%.

O desempenho do Maxwell® CSC DNA FFPE Kit foi avaliado através do isolamento de DNA a partir de amostras de tecido FFPE cujo tamanho varia entre 0,02–2,0 mm<sup>3</sup>.

O utilizador é responsável pelo estabelecimento das características de desempenho necessárias às aplicações de diagnóstico a jusante. Devem ser incluídos controlos adequados em todas as aplicações de diagnóstico a jusante que utilizem DNA purificado com o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit.

## 5. Antes de começar

### Materiais que devem ser fornecidos pelo utilizador

- microcentrifugadora
- pipetadores e pontas de pipeta para o pré-processamento de transferência de amostras para cartuchos de reagentes pré-cheios
- tubos de 1,5–2,0 ml para a incubação de amostras (por exemplo, microtubos, 1,5 ml [Cat.# V1231])
- blocos de aquecimento definidos para 56 °C e para 80 °C (**Nota:** blocos de aquecimento definidos para 56 °C e para 70 °C são necessários para realizar a incubação opcional durante a noite.)
- amostras de FFPE com um volume total de tecido até 2,0 mm<sup>3</sup> (**Nota:** as amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente [15–30 °C].)
- lâminas de barbear (**Nota:** tenha cuidado ao utilizar lâminas de barbear para raspar a amostra da lâmina.)



### 5.A. Preparação de amostras FFPE

#### Pré-processamento de amostras de secção

1. Coloque a secção num tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml. Se estiver a utilizar secções de tecido montadas na lâmina, raspe a secção da lâmina com uma lâmina de barbear limpa.
2. Adicione 300 µl de óleo mineral aos tubos de amostra. Agite por rotação durante 10 segundos.
3. Aqueça as amostras a 80 °C durante 2 minutos. Aguarde até que as amostras fiquem à temperatura ambiente enquanto prepara a "master mix".
4. Prepare uma "master mix" de tampão de lise, de proteinase K e de corante azul, conforme apresentado abaixo.

Reagente	Quantidade/Reação	Reações	
		(número a executar + 1)	Total
Tampão de lise	224 µl	n + 1	224 × (n + 1) µl
Proteinase K	25 µl	n + 1	25 × (n + 1) µl
Corante azul	1 µl	n + 1	1 × (n + 1) µl

5. Adicione 250 µl de Master Mix a cada tubo de amostra e agite por rotação durante 5 segundos.
6. Centrifugue a 10.000 × g durante 20 segundos para separar as camadas. Se existir precipitado na camada aquosa (camada inferior azul), misture suavemente a fase aquosa com uma pipeta.
7. Transfira os tubos de amostra para um bloco de aquecimento a 56 °C e incube durante 30 minutos.

8. Escolha um dos seguintes tempos e temperaturas de incubação:
  - a. **Método padrão:** transfira os tubos de amostra para um bloco de aquecimento a 80 °C e incube durante 4 horas.
  - b. **Método opcional:** faça a incubação das amostras durante a noite a 70 °C durante 14–18 horas.

**Nota:** para volumes mais baixos de introdução de amostras (menos de 0,1 mm<sup>3</sup>), a incubação opcional durante a noite a 70 °C pode não ser ideal. Utilize o método padrão de 4 horas a 80 °C se a incubação durante a noite falhar na purificação da concentração suficiente de DNA para volumes mais baixos de introdução de amostras.
9. Transfira os tubos de amostra para a bancada e aguarde que a amostra arrefeça até à temperatura ambiente durante 5 minutos.
10. Adicione 10 µl de RNase A à fase aquosa azul de cada tubo de amostra. Misture pipetando.
11. Incube durante 5 minutos à temperatura ambiente (15–30 °C). Durante esta incubação, prepare os cartuchos conforme descrito na Secção 5.B.
12. Centrifugue à velocidade máxima numa microcentrifugadora durante 5 minutos.
13. Transfira imediatamente a fase aquosa azul que contém o DNA para o poço n.º 1 de um Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge.

### 5.B. Preparação dos Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge

1. Troque de luvas antes de manusear os Maxwell® FFPE Cartridges, os êmbolos CSC/RSC e os tubos de eluição. Os cartuchos estão instalados nos tabuleiros da plataforma fora do instrumento e o tabuleiro da plataforma que contém os cartuchos e as amostras são transferidos para o instrumento para purificação. Coloque cada um dos cartuchos no tabuleiro da plataforma com o poço n.º 1 (o poço maior do cartucho) o mais afastado possível dos tubos de eluição (Figura 2). Pressione para baixo o cartucho de forma a encaixá-lo na respetiva posição. Certifique-se de que ambas as extremidades do cartucho estão totalmente encaixadas no tabuleiro da plataforma. Remova cuidadosamente o selo de forma a retirar a totalidade do selo da parte superior do cartucho. Certifique-se de que remove a totalidade da película aderente vedante e eventuais resíduos de adesivo do cartucho.



**Atenção:** manuseie os cartuchos com cuidado. As extremidades do selo podem ser cortantes.

2. Coloque um êmbolo no poço n.º 8 de cada cartucho.
3. Coloque um tubo de eluição vazio na posição do tubo de eluição para cada cartucho nos tabuleiros da plataforma.

**Nota:** utilize apenas os tubos de eluição fornecidos no Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Outros tubos de eluição podem não ser compatíveis com o Maxwell® CSC Instruments e podem afetar o desempenho de purificação de DNA.

### 5.B. Preparação dos Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge (continuação)

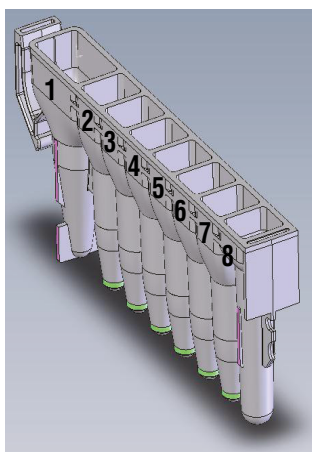
4. Adicione 50 µl de Nuclease-Free Water ao fundo de cada tubo de eluição.

**Nota:** utilize apenas a Nuclease-Free Water fornecida no Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. A utilização de outros tampões de eluição pode afetar a purificação de DNA.

#### Notas de preparação dos Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge



Os pingos de reagente ou de amostra retidos em qualquer parte do tabuleiro da plataforma deverão ser limpos com uma solução de água e detergente, seguido de um spray ou toalhete bactericida e em seguida, água. Não utilize lixívia em nenhum componente do instrumento.



#### Adições do utilizador ao conteúdo do poço:

1. Amostra pré-processada
8. Êmbolo CSC/RSC

**Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge.** A amostra FFPE pré-processada é adicionada ao poço n.º 1 e um êmbolo é adicionado ao poço n.º 8.



**Figura 2. Instalação e configuração do tabuleiro de plataforma.** A Nuclease-Free Water é adicionada aos tubos de eluição, conforme indicado.

## 6. Execução do instrumento

O Maxwell® CSC DNA FFPE Method para o Maxwell® CSC Instrument pode ser transferido do website da Promega: [www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-cscsoftware-firmware-methods/](http://www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-cscsoftware-firmware-methods/). O Maxwell® CSC DNA FFPE Method para o Maxwell® CSC 48 Instrument pode ser transferido do website da Promega:

[www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-csc-48-methods/](http://www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-csc-48-methods/)

1. Ligue o Maxwell® Instrument e o Tablet PC. Acesse ao Tablet PC e inicie o software Maxwell® IVD-mode tocando duas vezes no ícone no ambiente de trabalho. O instrumento executa uma auto-verificação e coloca todas as peças móveis na respetiva posição inicial.
2. Selecione **Iniciar** no ecrã Página Inicial.
3. Digitalize ou introduza o código de barras do canto superior direito da etiqueta do Maxwell® CSC DNA FFPE Kit e toque em **OK** para selecionar automaticamente o método a executar (Figura 3).

**Nota:** o código de barras do método do Maxwell® CSC DNA FFPE Kit é necessário para a purificação de DNA no Maxwell® CSC Instruments. A etiqueta do kit contém dois códigos de barras. O código de barras do método é indicado na Figura 3. Contacte o nosso centro de assistência, Promega Technical Services, caso o código de barras não possa ser digitalizado.



**Figura 3. Etiqueta do kit que indica o código de barras a digitalizar.** Digitalize o código de barras na caixa vermelha, no canto superior da etiqueta do kit, para iniciar uma execução de purificação.

4. No ecrã de "Configuração do cartucho", toque nas posições do cartucho para selecionar/anular a seleção de qualquer posição a utilizar para a execução da extração. Introduza qualquer informação de acompanhamento de amostra e toque no botão **Prosseguir** para continuar.  
**Nota:** quando estiver a usar o Maxwell® CSC 48 Instrument, toque no botão **Anterior** ou **Posterior** para marcar ou desmarcar as posições dos cartuchos em cada tabuleiro de plataforma.
5. Depois de abrir a porta, confirme que todos os itens da lista de verificação de extração foram realizados. Verifique se as amostras pré-processadas foram adicionadas ao poço n.º 1 dos cartuchos, se os cartuchos estão carregados no instrumento, se os tubos de eluição destapados estão presentes com tampão de eluição e se os êmbolos estão colocados no poço n.º 8. Transfira o tabuleiro da plataforma que contém os cartuchos preparados para a plataforma do Maxwell® instrument.

## 6. Execução do instrumento (continuação)

**Inserir o tabuleiro da plataforma Maxwell®:** segure o tabuleiro da plataforma de ambos os lados para evitar que os cartuchos saiam dos respectivos encaixes no tabuleiro da plataforma. Certifique-se de que o tabuleiro da plataforma é colocado no Maxwell® Instrument com os tubos de eluição próximos da porta. Posicione o ângulo da parte posterior do tabuleiro da plataforma para baixo e coloque no instrumento de maneira a que a parte posterior do tabuleiro da plataforma fique apoiada na parte posterior da plataforma do instrumento. Pressione a parte dianteira do tabuleiro da plataforma para baixo para assentar o tabuleiro da plataforma na plataforma de instrumentos. Se tiver dificuldade em encaixar o tabuleiro da plataforma na plataforma, verifique se o tabuleiro da plataforma está na orientação correta. Assegure-se de que o tabuleiro da plataforma se encontra nivelado com a plataforma de instrumentos e totalmente assente.

**Nota:** verifique o identificador nas bandejas de convés Maxwell® de 24 posições para determinar se devem ser colocadas na frente ou atrás do instrumento.

6. Confirme se todos os pré-processamentos indicados foram realizados e toque em **Iniciar** para fechar a porta do instrumento e iniciar o processamento.

**Nota:** ao utilizar o Maxwell® Instrument de 48 posições, se o Sistema de Visão tiver sido ativado, os tabuleiros da plataforma serão digitalizados à medida que a porta se retrai. Quaisquer erros na configuração do tabuleiro de plataforma (por exemplo, êmbolos não presentes no poço n.º 8, tubos de eluição não presentes e abertos) irão causar o software regressar ao ecrã "Configuração do cartucho" e as posições problemáticas serão marcadas com um ponto de exclamação num círculo vermelho. Toque no ponto de exclamação para obter uma descrição do erro e resolver todos os estados de erro. Toque no botão **Iniciar** novamente para repetir a digitalização do tabuleiro da plataforma e iniciar a extração.



**Aviso:** perigo de entalamento.

7. O Maxwell® Instrument irá iniciar imediatamente a execução de purificação. O ecrã irá apresentar os passos realizados e o tempo aproximado restante na execução.

### Notas:

- a. Toque no botão **Abortar** para abandonar a execução. Todas as amostras de uma execução abortada serão perdidas.
  - b. Se a execução for abandonada antes da conclusão, poderá ser-lhe pedido para verificar se os êmbolos ainda estão carregados na barra do êmbolo. Se os êmbolos estão presentes na barra do êmbolo, deve desempenhar uma **Limpeza** quando pedido. Se os êmbolos não estão presentes na barra do êmbolo, pode escolher saltar a **Limpeza** quando pedido. As amostras serão perdidas.
8. Uma vez concluída a execução, a interface do utilizador irá apresentar uma mensagem que o método terminou.

### Fim da execução

9. Siga as instruções apresentadas no ecrã no final do método para abrir a porta. Verifique se os êmbolos se encontram no poço n.º 8 do cartucho, no final da execução. Se os êmbolos não forem removidos da barra de êmbolo, siga as instruções do Manual de Operação adequadas para o Maxwell® Instrument (ver Tabela 1) para desempenhar um processo de **Limpeza** para tentar descarregar os êmbolos.

10. Tape e remova os tubos de eluição que contêm DNA imediatamente a seguir à execução para evitar a evaporação dos eluatos. Remova o tabuleiro da plataforma Maxwell® do instrumento.

**Nota:** para remover o tabuleiro da plataforma do instrumento, segure em ambos os lados do tabuleiro da plataforma. Certifique-se de que as amostras foram removidas do instrumento antes de executar o protocolo de desinfecção UV, para evitar danificar o ácido nucleico purificado. As amostras de DNA podem ser armazenadas até uma semana a 4 °C e até um mês a -20 °C.



11. Remova os cartuchos e os êmbolos do tabuleiro de plataforma e elimine os resíduos perigosos de acordo com os procedimentos da instituição. Os cartuchos, os êmbolos e os tubos de eluição destinam-se a uma única utilização. Não reutilize os Maxwell® FFPE Cartridges, os êmbolos CSC/RSC ou os tubos de eluição.

## 7. Pós-purificação

Determine se a colheita da amostra de DNA purificado corresponde aos requisitos de introdução do ensaio de diagnóstico a jusante adequado antes da utilização nesse ensaio. O desempenho do kit foi avaliado com base na purificação de DNA amplificável. Outros meios de quantificação, incluindo a absorvância ou a ligação de corante fluorescente, podem não se correlacionar com a amplificação (1). As leituras de absorvância das amostras FFPE purificadas podem sobreavaliar a colheita; recomendamos que utilize outros métodos para determinar a colheita (1).

## 8. Avaliação do desempenho analítico

O desempenho analítico do Maxwell® CSC DNA FFPE Kit foi avaliado utilizando amostras de tecido FFPE humano no Maxwell® CSC Instrument. Foi demonstrado desempenho equivalente do Maxwell® CSC DNA FFPE Kit com o Maxwell® CSC 48 Instrument como parte do desenvolvimento desse instrumento.

### 8.A. Amplificabilidade

**Tabela 2. Amplificabilidade do DNA purificado a partir de secções de tecido FFPE.** O DNA foi purificado de secções de tecido FFPE únicas de tamanho comum utilizando o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit com métodos de pré-processamento padrão e durante a noite. A quantidade de DNA extraído foi avaliada por PCR em tempo real destinado à RNase P (102 bp) como o alvo de quantificação. A amplificação do gene de transcriptase reversa da telomerase (TERT; 164 bp) foi medida como um alvo do gene de cópia única e tamanho maior para avaliar a qualidade do DNA. Algumas amostras que falharam ao amplificar foram rastreadas à fraca qualidade das amostras de introdução, visto que um resultado de falha semelhante foi observado ao utilizar um kit concorrente para purificar o DNA das amostras. Os dados das amostras que foram consideradas como sendo de fraca qualidade foram excluídos da análise. É apresentada a concentração de DNA média para cada conjunto de replicados. Todas as secções de tecido FFPE originaram uma colheita, pelo menos, 100 cópias/μl de RNase P e eram detetáveis para TERT quando pré-processadas utilizando os métodos padrão e durante a noite.

## 8.A. Amplificabilidade (continuação)

**Tabela 2. Amplificabilidade do DNA purificado a partir de secções de tecido FFPE (continuação).**

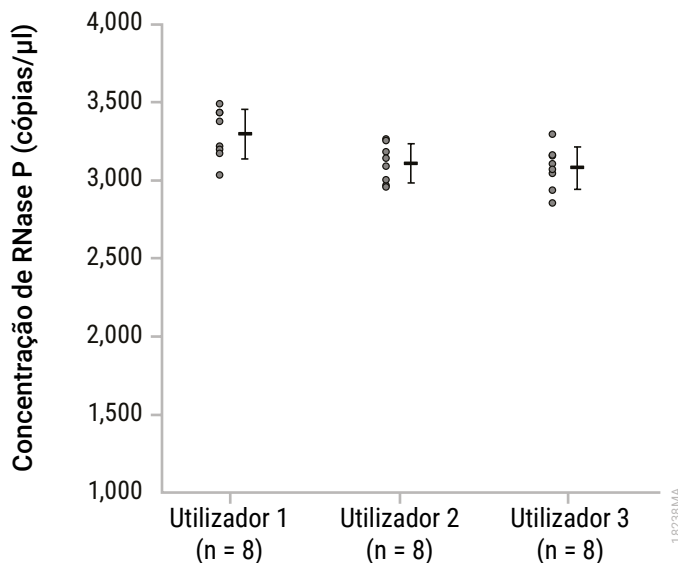
Tecido	Condições de pré-processamento	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
		Concentração (cópias/μl) ou Detecção		Concentração (cópias/μl) ou Detecção		Concentração (cópias/μl) ou Detecção	
		RNase P	TERT	RNase P	TERT	RNase P	TERT
Mama*	Padrão	439	Detetado				
	Durante a noite	273	Detetado				
Cólon*	Padrão	1313	Detetado	2277	Detetado		
	Durante a noite	983	Detetado	1050	Detetado		
Esófago*	Padrão	366	Detetado	1314	Detetado		
	Durante a noite	243	Detetado	755	Detetado		
Fígado*	Padrão	2472	Detetado	475	Detetado		
	Durante a noite	2206	Detetado	434	Detetado		
Pulmão	Padrão	2939	Detetado	3006	Detetado	5217	Detetado
	Durante a noite	1176	Detetado	1510	Detetado	3230	Detetado
Pâncreas	Padrão	570	Detetado	738	Detetado	110	Detetado
	Durante a noite	454	Detetado	565	Detetado	114	Detetado
Próstata	Padrão	936	Detetado	1003	Detetado	3064	Detetado
	Durante a noite	829	Detetado	634	Detetado	1931	Detetado
Estômago	Padrão	659	Detetado	548	Detetado	404	Detetado
	Durante a noite	454	Detetado	245	Detetado	223	Detetado
Bexiga	Padrão	482	Detetado	421	Detetado	296	Detetado
	Durante a noite	355	Detetado	331	Detetado	262	Detetado
Intestino delgado	Padrão	741	Detetado	424	Detetado	1903	Detetado
	Durante a noite	441	Detetado	389	Detetado	1070	Detetado
Útero	Padrão	2124	Detetado	3921	Detetado	4081	Detetado
	Durante a noite	1556	Detetado	3117	Detetado	2532	Detetado

\*O tecido de mama de uma amostra foi testado. Foram testados tecidos do cólon, esófago e fígado de duas amostras diferentes. Para todos os demais tipos de tecidos, foram testadas três amostras diferentes. As células da tabela com sombreado escuro indicam amostras que não foram testadas.

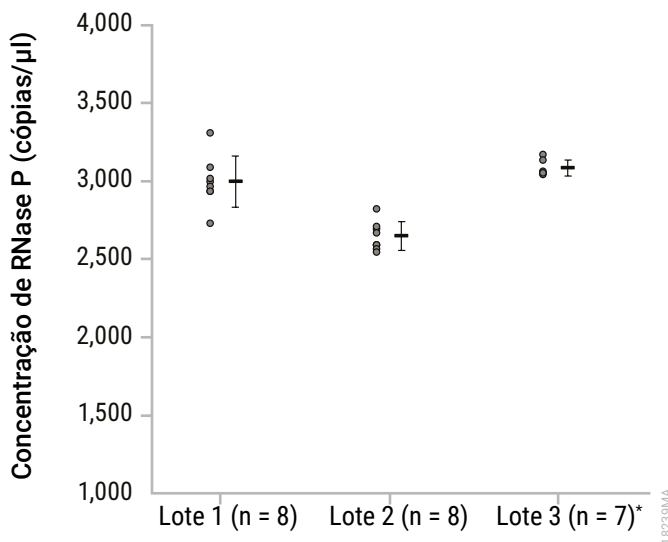
**Tabela 3. Reprodutibilidade da amplificação de DNA.** Três utilizadores separados purificaram o DNA de secções de tecido FFPE de tamanho reduzido utilizando o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. O DNA foi purificado a partir de secções de tecido do cólon e do fígado de 0,02 mm<sup>3</sup> e 0,1 mm<sup>3</sup> cumprindo o método de pré-processamento padrão. A concentração de DNA foi determinada por qPCR em duplicado utilizando um alvo de RNase P (102 bp), e a concentração de DNA média para secção de tecido e cada tipo de tecido foi calculada para cada utilizador. A concentração de DNA média mais baixa de todos os utilizadores e todos os tecidos para tecido de 0,02 mm<sup>3</sup> e 0,1 mm<sup>3</sup> era de 45 cópias/μl e 260 cópias/μl, respetivamente.

<b>Tecido</b>	<b>ID do utilizador</b>	<b>Tamanho da amostra de tecido</b>	<b>Concentração (cópias/μl)</b>
Cólon	1	0,10 mm <sup>3</sup>	332
		0,02 mm <sup>3</sup>	108
	2	0,10 mm <sup>3</sup>	445
		0,02 mm <sup>3</sup>	188
	3	0,10 mm <sup>3</sup>	383
		0,02 mm <sup>3</sup>	45
Fígado	1	0,10 mm <sup>3</sup>	401
		0,02 mm <sup>3</sup>	54
	2	0,10 mm <sup>3</sup>	307
		0,02 mm <sup>3</sup>	73
	3	0,10 mm <sup>3</sup>	260
		0,02 mm <sup>3</sup>	68

## 8.B. Reprodutibilidade



**Figura 4. A reprodutibilidade entre utilizadores da purificação de DNA foi caracterizada por três utilizadores a purificar DNA de secções em série de uma amostra de tecido mamário FFPE.** Os eluatos foram amplificados por qPCR utilizando um alvo de RNase P (102 bp) e foram calculadas as concentrações de DNA médias e valores de CV inter e intra execução. Os valores de CV intra execução eram de 4,9% (utilizador 1), 4,0% (utilizador 2) e 4,5% (utilizador 3), e de CV inter execução em todos os três utilizadores era de 5,3%, demonstrando reprodutibilidade da purificação de DNA por cada utilizador e todos os múltiplos utilizadores. No caso de cada conjunto de dados, os pontos à esquerda representam os valores da amostra individual, ao passo que a média com o desvio padrão é apresentada à direita.



**Figura 5. A reprodutibilidade entre lotes da purificação de DNA era caracterizada por um único utilizador a purificar o DNA de secções de série de uma amostra de tecido mamário FFPE utilizando três lotes de Maxwell® CSC DNA FFPE Kit.** Os eluatos foram amplificados por qPCR utilizando um alvo de RNase P (102 bp) e foram calculadas as concentrações de DNA médias, demonstrando reprodutibilidade da purificação do ADN utilizando cada lote. No caso de cada conjunto de dados, os pontos à esquerda representam os valores da amostra individual, ao passo que a média com o desvio padrão é apresentada à direita. \*O teste de Dixon admitiu a exclusão de um replicado neste conjunto como outlier com base no limite de confiança de 95%. Este replicado foi excluído da análise.

### 8.C. Inibição (Substâncias interferentes)

**Tabela 4. Analisar DNA purificado para substâncias interferentes.** O DNA foi purificado de uma ou duas secções de tecido do colón e fígado FFPE montadas na lâmina e de tamanho comum utilizando os métodos de pré-processamento padrão e durante a noite com o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Para cada DNA purificado, foram montados dois conjuntos de amplificações utilizando 2 µl e 8 µl de introdução de DNA, e a diferença nos valores de  $C_q$  ( $\Delta C_q$ ) entre as duas introduções de DNA foi calculada. Um  $\Delta C_q$  de 2 seria esperado para uma diferença quádrupla na introdução de DNA. Todas as condições testadas resultaram em valores de  $\Delta C_q$  de  $2 \pm 1$  ciclo, demonstrando que quaisquer potenciais substâncias interferentes que co-purificadas com o DNA não interferem com a amplificação a jusante.

Tipo de tecido FFPE	Condições de pré-processamento	Número de secções de tecido FFPE	RNase P		
			2 µl de $C_q$ médio (Ciclos)	8 µl de $C_q$ médio (Ciclos)	$\Delta C_q$ médio (Ciclos)
Cólón	Padrão	1 (n = 3)	26,4	24,5	1,9
		2 (n = 3)	25,7	23,6	2,0
	Durante a noite	1 (n = 2)	28,3	26,0	2,3
		2 (n = 3)	27,5	25,0	2,4
Fígado	Padrão	1 (n = 3)	25,5	23,5	2,0
		2 (n = 3)	24,5	22,6	1,9
	Durante a noite	1 (n = 3)	26,8	24,7	2,1
		2 (n = 3)	25,8	23,7	2,0

### 8.D. Contaminação cruzada

O DNA foi extraído de oito secções de replicado de uma amostra de tecido pulmonar FFPE e oito controlos negativos (água) utilizando o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Os Maxwell® CSC cartridges contendo as amostras FFPE pré-processadas ou controlo negativo (água) foram processados em posições alternadas na plataforma no Maxwell® CSC Instrument. Para determinar se ocorreu qualquer contaminação cruzada entre as amostras, os eluatos resultantes foram testados em duplicado por qPCR destinado ao gene de RNase P (102 bp) para detetar qualquer contaminação do DNA nos controlos negativos de amostras FFPE próximas. Não foi observado qualquer DNA contaminante em qualquer um dos controlos negativos.

## 9. Avaliação do desempenho clínico

O desempenho clínico do Maxwell® CSC DNA FFPE Kit foi avaliado por um laboratório clínico externo utilizando amostras de tecido FFPE humano e o Maxwell® CSC Instrument.

### 9.A. Amplificabilidade do DNA

**Tabela 5. Amplificabilidade do DNA extraído a partir de tecidos FFPE.** O DNA extraído de um total de 21 amostras de tecido FFPE utilizando o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit e o Maxwell® CSC Instrument foi amplificado num ensaio de qPCR destinado ao gene c-KIT de tipo selvagem utilizando o teste COLD-PCR C-KIT D816V do laboratório de teste. O DNA extraído das mesmas amostras utilizando o método de purificação de ácido nucleico padrão do laboratório (Método de referência de laboratório) foi amplificado no mesmo ensaio para fins de comparação. A diferença nos valores de  $C_q$  ( $\Delta C_q$ ) entre o DNA purificado da mesma amostra de tecido FFPE utilizando o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit e o Método de referência de laboratório é apresentado. A amplificabilidade do DNA purificado do Maxwell® CSC DNA FFPE Kit correlaciona-se com o Método de referência de laboratório.

Amostra de tecido FFPE	Média $C_q$		$\Delta C_q$
	Maxwell® CSC DNA FFPE Kit	Método de referência de laboratório	
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. Reprodutibilidade

**Tabela 6. Reprodutibilidade dos resultados entre os dispositivos de teste.** Para demonstrar a consistência dos resultados entre dispositivos de teste num ambiente do utilizador comum, o DNA extraído de sete amostras de tecido FFPE diferentes por dois dispositivos de teste separados utilizando o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit foi amplificado por qPCR destinado ao gene c-KIT de tipo selvagem utilizando o teste COLD-PCR C-KIT D816V do laboratório de teste. Os eluatos da mesma amostra de tecido FFPE foram testados no mesmo ensaio para minimizar o efeito da variabilidade do ensaio de qPCR nos resultados. A diferença nos valores de  $C_q$  ( $\Delta C_q$ ) obtida utilizando o DNA purificado da mesma amostra de tecido FFPE por dois dispositivos de teste é apresentada na tabela. O  $\Delta C_q$  entre dispositivos de teste variou entre 0,12–0,97, demonstrando a reprodutibilidade do DNA amplificado por múltiplos dispositivos de teste.

Amostra de tecido FFPE	Valor do $C_q$ médio		$\Delta C_q$
	Dispositivo de teste 1	Dispositivo de teste 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. Contaminação cruzada

A contaminação cruzada ocorrendo entre as amostras durante a extração do DNA utilizando o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit no ambiente do utilizador comum foi avaliada. A extração do DNA utilizando o Maxwell® CSC DNA FFPE Kit foi realizada com oito amostras de tecido FFPE diferentes e oito controlos negativos (água) na mesma execução do instrumento. Os Maxwell® CSC cartridges contendo amostras de tecido FFPE ou controlos negativos (água) foram processados em posições alternadas e adjacentes na plataforma no Maxwell® CSC Instrument. Os eluatos resultantes foram testados em duplicado por qPCR destinado ao gene c-KIT de tipo selvagem utilizando o teste COLD-PCR C-KIT D816V do laboratório de teste para detetar qualquer DNA contaminante nos controlos negativos das amostras FFPE adjacentes. Não foi observado qualquer DNA contaminante nos oito controlos negativos.

## 10. Resolução de Problemas

Contacte a filial ou o distribuidor local da Promega para obter respostas para questões não abordadas neste manual. Informação de contacto disponível em: **www.promega.com** Email: **techserv@promega.com**

### Sintomas

Concentração mais baixa do que a esperada de DNA no eluato (uma secção FFPE típica deve apresentar uma colheita de DNA amplificável dependendo do tamanho do tecido, celularidade, manuseamento e condição da fixação de formol)

### Causas e observações

O desempenho do kit foi avaliado através do isolamento de DNA a partir de amostras de tecido FFPE com tamanho até 2,0 mm<sup>3</sup>. Não foi concebido para volumes de amostras superiores a 2,0 mm<sup>3</sup>. Utilize apenas secções que cumprem as especificações do tamanho.

O kit foi concebido para utilização com amostras de tecido FFPE. Não foi concebido para utilização com amostras de tecido não FFPE, como amostras de tecido frescas ou congeladas. Os tempos de incubação e as temperaturas foram testados para assegurar o rendimento ideal.

O kit não foi concebido para ser utilizado com amostras de tecido que tenham sido preparadas com fixadores diferentes do formol neutro tamponado a 10%. Verifique junto do laboratório de patologia ou do fornecedor para se certificar de que não foi utilizado um fixador alternativo.

Não existem quaisquer características para secções ou lâminas com coloração. Repita a purificação com uma secção ou lâmina sem coloração.

O desempenho do kit foi avaliado com base na purificação de DNA amplificável. Outros meios de quantificação, incluindo a absorvância ou a ligação de corante fluorescente, podem não se correlacionar com a amplificação. Utilize uma quantificação de amplificação para avaliar a purificação.

Para volumes mais baixos de introdução de amostras (menos de 0,1 mm<sup>3</sup>), a incubação opcional durante a noite a 70 °C pode não ser ideal. Utilize o método padrão decrosslinking de 4 horas a 80 °C se a incubação durante a noite falhar na purificação da concentração suficiente de DNA para volumes mais baixos de introdução de amostras.

## 10. Resolução de Problemas (continuação)

### Sintomas

Qualidade mais baixa do que a esperada (o eluato contém DNA extremamente fragmentado ou inibidores de ensaios a jusante)

### Causas e observações

A secção de tecido utilizada para a purificação pode conter DNA fragmentado devido o manuseamento e às condições de fixação de formol. Caso o DNA seja fragmentado antes da extração/purificação, o DNA fragmentado será purificado com este kit. Repita com uma secção adjacente para avaliar se existe algum problema com a secção ou com o processo.

Alguns ensaios com base na amplificação são particularmente sensíveis aos inibidores. Os controlos de ensaios a jusante devem identificar a presença de um inibidor de amplificação no eluato. É da responsabilidade do utilizador confirmar a compatibilidade deste produto com os ensaios a jusante.

Qualquer incidente grave que ocorra relacionado com o dispositivo que conduza, ou possa conduzir, a morte ou ferimentos graves de um utilizador ou paciente deverá ser comunicado imediatamente ao fabricante. Os utilizadores que se encontrem na União Europeia também deverão reportar incidentes graves à Autoridade Competente no país onde o utilizador e/ou o paciente se encontrem.

## 11. Bibliografia

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

## 12. Produtos Relacionados

### Instrumento e acessórios

Produto	Tamanho	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	1 de cada	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 de cada	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 de cada	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 de cada	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 de cada	AS8402
Microtube, 1,5 ml	1000/pack	V1231

\*Para utilização em diagnóstico in vitro. Este produto está disponível apenas em alguns países.

### Maxwell® CSC Reagent Kits

Visite [www.promega.com](http://www.promega.com) para obter uma lista dos Maxwell® CSC Purification Kits disponíveis.

### **13. Resumo das alterações**

Foram realizadas as seguintes alterações à revisão 10/22 do presente documento:

1. O título da Secção 3 A atualizar para Finalidade prevista/Utilização prevista do produto.
2. As Secções 8 e 9 foram adicionadas.
3. Documento atualizado em conformidade com a Regulamentação (UE) 2017/746 sobre dispositivos médicos para diagnóstico in vitro.

<sup>(e)</sup>Pat. dos EUA N.º 7,329,488 e S. Korean Pat. N.º 100483684.

© 2013–2022 Promega Corporation. Todos os direitos reservados.

Maxwell é uma marca comercial registada da Promega Corporation.

Os produtos podem estar cobertos por patentes pendentes ou por patentes emitidas ou podem ter algumas limitações. Visite o nosso Web site para obter mais informações.

Todos os preços e especificações estão sujeitos a alterações sem aviso prévio.

As características dos produtos estão sujeitas a alteração. Contacte o nosso centro de assistência, Promega Technical Services, ou aceda ao catálogo da Promega online para obter as informações mais recentes acerca dos produtos da Promega.