

MANUAL TÉCNICO

Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA Kit

Instruções de utilização do produto
AS1580

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

Nota: para utilizar o Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA Kit, o método do Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA tem de ser carregado no Maxwell[®] CSC ou no Maxwell[®] CSC 48 Instrument.



INSTRUÇÕES DE
UTILIZAÇÃO DO PRODUTO
AS1580



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany

Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA Kit

Toda a literatura técnica está disponível na Internet em: 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

1. Descrição	2
2. Componentes do produto, Condições de armazenamento e Legenda de símbolos	3
3. Finalidade prevista/Utilização prevista do produto	5
4. Limitações de Utilização do Produto	5
5. Preparação de amostras de plasma	6
6. Preparação dos Maxwell [®] CSC Rapid ccfDNA Cartridges	7
7. Configuração e execução do Maxwell [®] Instrument	10
8. Pós-purificação	13
9. Avaliação do desempenho analítico	13
9.A. Quantidade e qualidade de ccfDNA	13
9.B. Amplificabilidade e inibição (Substâncias interferentes)	15
9.C. Quantificação de ccfDNA por corante fluorescente e qPCR	15
9.D. Reprodutibilidade	16
9.E. Contaminação cruzada	16
9.F. Compatibilidade com sequenciação de nova geração	16
9.G. Compatibilidade com PCR digital	17
10. Avaliação do desempenho clínico	17
11. Considerações a ter em conta ao trabalhar com ccfDNA	17
11.A. Preparação do plasma	17
11.B. Recomendações para a quantificação de ccfDNA	18
12. Resolução de problemas	19
13. Produtos relacionados	20

O Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit está disponível apenas em alguns países.

1. Descrição

O Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit é utilizado com os Maxwell® Instruments especificados na Tabela 1 para fornecer um método fácil para a extração e a purificação eficientes e automáticas de ADN livre de células circulantes (ccfDNA) a partir de 1–4 ml de amostras de plasma humano. Os Maxwell® CSC Instruments são concebidos para serem utilizados com cartuchos de reagentes pré-dispensados e métodos de extração pré-programados, proporcionando uma maior simplicidade e comodidade. O método do Maxwell® CSC Rapid ccfDNA consegue processar desde uma até ao número máximo de amostras suportado pelos Maxwell® CSC Instruments em menos de 30 minutos. O ccfDNA extraído pode ser utilizado diretamente em diversas aplicações a jusante, como a PCR digital e a sequenciação de nova geração (NGS).

Tabela 1. Instrumentos suportados.

Instrumento	Cat.#	Manual técnico	Número de amostras máximo
Maxwell® CSC	AS6000	TM457	16
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623	48

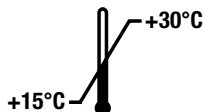
Princípio do método

O Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit purifica o ccfDNA a partir de amostras de plasma utilizando partículas paramagnéticas, que fornecem uma fase sólida móvel que otimiza a captura, a lavagem e a purificação de amostras de ccfDNA. Os Maxwell® Instruments são instrumentos de manuseamento de partículas magnéticas que ligam de forma eficiente o ccfDNA às partículas paramagnéticas nos primeiros três poços de um cartucho pré-cheio. As amostras são processadas através de uma série de lavagens antes de o ccfDNA ser eluído. Esta abordagem de 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.

2. Componentes do produto, Condições de armazenamento e Legenda de símbolos

PRODUTO	TAMANHO	CAT.#
Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit	48 preparações	AS1580

Para utilização em diagnóstico in vitro. Exclusivamente para utilização profissional. Contém reagentes suficientes para 48 isolamentos automáticos de ccfDNA a partir de amostras de plasma. Os cartuchos destinam-se apenas a uma única utilização.



Inclui:

- 48 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (CSCS)
- 50 CSC/RSC Plungers
- 50 Elution Tubes (0,5 ml)
- 20 ml Elution Buffer (RCFD)
- 1 ml Solução de proteinase K (PK2)

Condições de armazenamento: armazene o Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit entre +15 °C a +30 °C.



Informação de segurança: consulte a Ficha de dados de segurança (SDS) para obter informações detalhadas sobre segurança. Cumpra as diretrizes institucionais quanto ao manuseamento e à eliminação de resíduos químicos utilizados com este sistema.





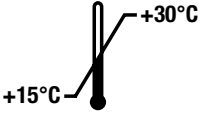











Os Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (CSCS) foram concebidos para utilização com substâncias potencialmente infecciosas. Deve ser utilizada proteção adequada (por exemplo, luvas e óculos de proteção) ao manusearem substâncias infecciosas. Cumpra as suas diretrizes institucionais quanto ao manuseamento e à eliminação de substâncias infecciosas, quando utilizadas com este sistema.



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

Informação adicional: os componentes do Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit são qualificados e testados de acordo com o controlo de qualidade para trabalharem em conjunto. Não misture componentes de kits com lotes de kits diferentes. Utilize apenas os componentes fornecidos no kit. Para obter informações de segurança adicionais, consulte a Ficha de dados de segurança, disponível em: www.promega.com

Legenda de símbolos

Símbolo	Explicação	Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro		Representante autorizado
	Conservar 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 Rapid ccfDNA Kit destina-se a ser utilizado, em conjunto com os Maxwell® CSC Instruments e com o método do Maxwell® CSC Rapid ccfDNA, como dispositivo médico (IVD) para diagnóstico in vitro para a realização do isolamento automático de ADN livre de células circulantes (ccfDNA) a partir de amostras de plasma humano.

O ccfDNA purificado é adequado para utilização em ensaios de diagnóstico in vitro com base na amplificação, incluindo a PCR digital.

O Maxwell® CSC Rapid ccfDNA 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.

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

4. Limitações de Utilização do Produto

O desempenho do Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit foi avaliado com amostras de plasma humano preparadas a partir de sangue total recolhido em Streck Cell-Free DNA BCT e tubos para recolha de sangue com anticoagulante K₂EDTA. O utilizador é responsável pela validação da utilização do Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit para purificar o ccfDNA a partir de plasma recolhido noutros tubos para recolha de sangue.

A adequação do ácido nucleico purificado com o Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit para utilização na sequenciação de nova geração (NGS) foi demonstrada durante o desenvolvimento do produto, mas não foi validada.

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

5. Preparação de amostras de plasma

Materiais que devem ser fornecidos pelo utilizador

- Colheita de sangue total ou plasma
- Centrifugadora de bancada

No caso do sangue total recolhido em tubos de EDTA, o sangue deve ser processado imediatamente após a recolha ou armazenado a uma temperatura entre +2 °C e +10 °C até à preparação do plasma. Centrifugue o sangue total dos tubos de EDTA durante ≥ 10 minutos a $\geq 2000 \times g$ para precipitar os glóbulos vermelhos e brancos. Para os dispositivos Streck Cell-Free DNA BCT[®], siga as instruções do fabricante. Após a primeira centrifugação dos tubos para recolha de sangue Streck Cell-Free DNA BCT[®] ou EDTA, utilize uma pipeta para remover cuidadosamente o máximo de plasma possível sem perturbar a camada leucocitária e transfira para um novo tubo. Para garantir que não são transferidos glóbulos brancos, centrifugue o plasma uma segunda vez durante ≥ 10 minutos a $\geq 2000 \times g$ e transfira o sobrenadante para um tubo limpo.

Armazene o plasma a uma temperatura entre +2 °C e +10 °C durante um máximo de 1 semana. Para períodos de armazenamento mais longos, armazene o plasma entre -30 °C e -10 °C (ou abaixo de -65 °C). Evite a exposição do plasma a ciclos de congelação-descongelação. Consulte a secção 11.A para considerações relativas à utilização de plasma congelado.

6. Preparação dos Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges

1. Troque de luvas antes de manusear os Maxwell® CSC Cartridges, os CSC/RSC Plungers e os Elution Tubes (0,5 ml). Coloque os cartuchos a utilizar no(s) tabuleiro(s) Maxwell® CSC/RSC com o poço n.º 1 (o primeiro dos maiores poços do cartucho) virado na direção contrária aos tubos de eluição. Pressione para baixo o cartucho de forma a encaixá-lo na respetiva posição. 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, antes de colocar os cartuchos no instrumento.



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

2. Dependendo do volume total da amostra de plasma, transfira o plasma apenas para o poço n.º 1 (primeiro poço maior), apenas para os poços n.º 1 e n.º 3 (primeiro e terceiro poços maiores) ou para os poços n.º 1, n.º 2 e n.º 3 (três poços maiores) do Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge, conforme indicado na Tabela 2. Altere as pontas de pipeta entre as diferentes amostras de plasma para evitar a contaminação cruzada.

Tabela 2. Transferência de amostras de plasma para diferentes poços do Maxwell® CSC Cartridge com base no volume de introdução da amostra.

Volume da amostra (ml)	Instruções para a transferência de amostras
1,0 ml a 1,5 ml de plasma	Adicione o plasma apenas ao poço n.º 1. Veja a Figura 1, Painel A.
> 1,5 ml a ≤ 3,0 ml de plasma	Adicione volumes iguais de plasma aos poços n.º 1 e n.º 3. Veja a Figura 1, Painel B.
3,0 ml a 4,0 ml de plasma	Adicione volumes iguais de plasma aos poços n.º 1, n.º 2 e n.º 3. Veja a Figura 1, Painel C.

Notas:

- **Não distribua mais de 1,5 ml de plasma por poço.**
- **Com volumes de introdução de plasma de 1,0–1,5 ml, toda a amostra de plasma deve ser carregada apenas no poço n.º 1.** O carregamento de plasma no poço n.º 2 ou n.º 3 vai afetar negativamente a recuperação de ccfDNA.
- **Com volumes de introdução de plasma de 1,5–3,0 ml, o plasma deve ser carregado apenas nos poços n.º 1 e n.º 3.** O carregamento de plasma em qualquer outra configuração de poço (por exemplo, nos poços n.º 2 e n.º 3 ou nos poços n.º 1 e n.º 2) vai afetar negativamente a recuperação de ccfDNA.

6. Preparação dos Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (continuação)

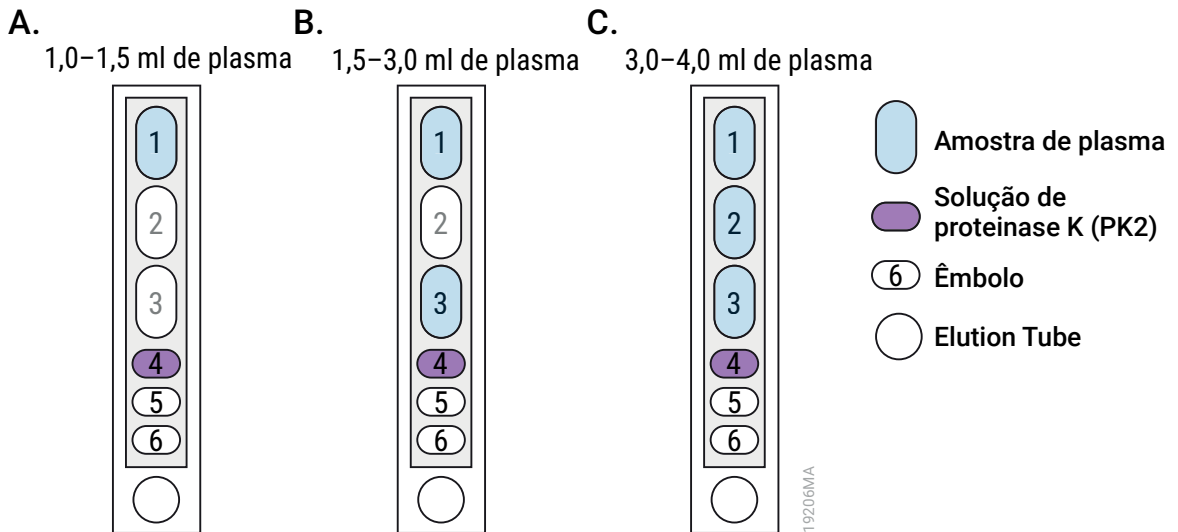


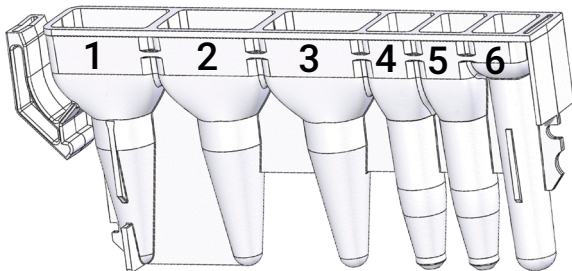
Figura 1. Transferência de amostras de plasma para diferentes poços do Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge com base no volume de introdução da amostra. Para amostras de plasma de 1,0–1,5 ml, transfira a totalidade da amostra para o poço n.º 1 (**Painel A**). Para amostras de plasma de 1,5–3,0 ml, transfira volumes iguais de plasma para os poços n.º 1 e n.º 3 (**Painel B**). Para amostras de plasma de 3,0–4,0 ml, transfira volumes iguais de plasma para os poços n.º 1, n.º 2 e n.º 3 (**Painel C**). Distribua 10 µl da solução de proteinase K (PK2) no poço n.º 4. Adicione 50 µl de Elution Buffer (RCFD) ao Elution Tube (representado pelo círculo na parte inferior de cada um dos painéis). Coloque um êmbolo no poço n.º 6.

- Distribua 10 µl da solução de proteinase K (PK2) no poço n.º 4.
- Coloque um êmbolo no poço n.º 6 de cada cartucho.
- Coloque um Elution Tube vazio na posição do tubo de eluição de cada cartucho no tabuleiro da plataforma. Adicione 50 µl de Elution Buffer (RCFD) ao fundo de cada Elution Tube.

6. Prossiga para a Secção 7, Configuração e execução do Maxwell® Instrument.

Notas:

- 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, seguida de um spray ou toalhete bactericida e, em seguida, água. Não utilize lixívia em nenhum componente do Maxwell® Instrument.
- Utilize apenas os Elution Tubes de 0,5 ml fornecidos com o kit. Outros tubos poderão ser incompatíveis com o Maxwell® Instrument.
- O Elution Tubes (RCFD) fornecido é essencial para uma recuperação eficaz de ccfDNA. Não substitua o Elution Tubes (RCFD) por tampões de eluição alternativos. A utilização de tampões de eluição alternativos vai afetar negativamente a recuperação de ccfDNA.
- É possível obter concentrações mais elevadas de ccfDNA com menos de 50 µl de Elution Tubes (RCFD), mas a colheita total pode ser reduzida.



19207TA

Adições do utilizador aos poços:

- Amostra de plasma (consulte a Tabela 2 e a Figura 1 para mais detalhes).
ou
- ,3. Amostra de plasma
ou
- ,2.,3. Amostra de plasma
- Solução de proteinase K (PK2)
- CSC/RSC Plunger

Figura 2. Maxwell® CSC Cartridge. A amostra de plasma é adicionada ao poço n.º 1 (1,0–1,5 ml de amostra), aos poços n.º 1 e n.º 3 (1,5–3,0 ml de amostra), ou aos poços n.º 1, n.º 2 e n.º 3 (3,0–4,0 ml de amostra), dependendo do volume da amostra; 10 µl de solução de proteinase K (PK2) são distribuídos no poço n.º 4 e um êmbolo é adicionado ao poço n.º 6.

6. Preparação dos Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (continuação)



Figura 3. Instalação e configuração do(s) tabuleiro(s) de plataforma. O Elution Buffer (RCFD) é adicionado aos tubos de eluição, conforme indicado. Os êmbolos encontram-se na posição n.º 6 do cartucho. O tabuleiro da plataforma é de Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000).

7. Configuração e execução do Maxwell® Instrument

Para informações detalhadas, consulte o Manual de funcionamento específico do seu Maxwell® CSC Instrument. Consulte a Tabela 1.

1. Ligue o Maxwell® Instrument e o Tablet PC. Inicie a sessão no Tablet PC e inicie o software Maxwell® CSC 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 no canto superior direito da etiqueta do Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit e selecione **OK** para selecionar automaticamente o método a executar (Figura 4).

Nota: o código de barras do método do Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit é necessário para a purificação de ccfDNA nos Maxwell® CSC Instruments. A etiqueta do kit contém dois códigos de barras. O código de barras do método é indicado na Figura 4. Contacte o nosso centro de assistência, Promega Technical Services, caso o código de barras não possa ser lido.



Figura 4. Etiqueta do kit que indica o código de barras a digitalizar. O código de barras a digitalizar para iniciar uma purificação é apresentado na caixa azul, na parte superior direita da etiqueta do kit.

4. No ecrã de "Configuração do cartucho", confirme que o método do Maxwell® CSC Rapid ccfDNA é apresentado no topo do ecrã. Selecione as posições do cartucho para selecionar ou anular a seleção de qualquer posição a utilizar para a execução da extração. Introduza qualquer informação de acompanhamento de amostra e selecione o botão **Prosseguir** para continuar.

Nota: com o Maxwell® CSC 48 Instrument, selecione ou anule a seleção das posições dos cartuchos em cada tabuleiro da plataforma utilizando os botões **Anterior** e **Posterior**.

5. Depois de abrir a porta, confirme que todos os itens da Lista de Verificação de Extração foram realizados. Verifique se as amostras de plasma foram adicionadas aos poços apropriados dos cartuchos, se a solução de proteinase K (PK2) foi adicionada ao poço n.º 4 do cartucho, se os êmbolos estão no poço n.º 6, se os cartuchos estão carregados no instrumento e se estão presentes elution tubes destapados com Elution Buffer (RCFD). Transfira o(s) tabuleiro(s) da plataforma que contém os cartuchos preparados para a plataforma do Maxwell® Instrument.

Inserir o(s) tabuleiro(s) da plataforma Maxwell®: Segure o tabuleiro da plataforma de ambos os lados para evitar que os cartuchos saiam dos respetivos 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 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 nos tabuleiros da plataforma Maxwell® de 24 posições para determinar se devem ser colocadas na frente ou atrás do instrumento.

7. Configuração e execução do Maxwell® Instrument (continuação)

6. Selecione o botão **Iniciar** para iniciar o ciclo de purificação. A plataforma vai retrair e a porta vai fechar.



Aviso: Perigo de entalamento.

Nota: se utilizar o Maxwell® Instrument de 48 posições e o Vision System tiver sido ativado, os tabuleiros da plataforma serão digitalizados à medida que a plataforma se retrai. Quaisquer erros na configuração do tabuleiro da plataforma (por exemplo, êmbolos não presentes no poço n.º 6, tubos de eluição não presentes e abertos) irão fazer com que o software regresse ao ecrã "Configuração do cartucho" e com que as posições problemáticas sejam marcadas com um ponto de exclamação num círculo vermelho. Selecione o ponto de exclamação para obter uma descrição do erro e resolver todos os estados de erro. Selecione o botão **Iniciar** novamente para repetir a leitura do tabuleiro da plataforma e iniciar a extração.

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

Notas:

- a. Selecionar o botão **Abortar** irá 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 do Maxwell® Instrument. Se os êmbolos estiverem presentes na barra do êmbolo, realize uma **Limpeza** quando pedido. Se os êmbolos não estiverem presentes na barra do êmbolo, pode optar por ignorar a **Limpeza** quando pedido. As amostras serão perdidas.
8. Uma vez concluída a execução, a interface do utilizador irá apresentar uma mensagem a indicar 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 6 do cartucho, no final da execução. Se os êmbolos não forem removidos da barra de êmbolo, siga as instruções do Manual Técnico adequadas para o seu Maxwell® Instrument (ver Tabela 1) para desempenhar um processo de **Limpeza** para tentar descarregar os êmbolos.
10. Remova o(s) tabuleiro(s) da plataforma do instrumento imediatamente a seguir à execução para evitar a evaporação dos eluatos. Remova os tubos de eluição que contêm ccfDNA e tape os tubos. Certifique-se de que as amostras de ácido nucleico purificado foram removidas do instrumento antes de executar um protocolo de desinfecção UV para evitar danos no ácido nucleico.
11. Remova os cartuchos e os êmbolos do(s) tabuleiro(s) da plataforma Maxwell®. Elimine os resíduos perigosos de acordo com os procedimentos da sua instituição. Não reutilize os Maxwell® CSC Cartridges, os CSC/RSC Plungers ou os Elution Tubes.



2

8. Pós-purificação

Determine se a amostra de ccfDNA purificada corresponde aos requisitos de introdução do ensaio de diagnóstico a jusante adequado antes da utilização nesse ensaio. Caso as amostras de ccfDNA purificadas não sejam processadas imediatamente, armazene-as a 4 °C durante um máximo de 7 dias. No caso de um tempo de armazenamento superior, congele a -20 °C ou -70 °C ou menos. Consulte as instruções para obter informações sobre aplicações a jusante relativas às recomendações de armazenamento e manuseamento de amostras específicas.

9. Avaliação do desempenho analítico

O desempenho analítico do Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit foi avaliado utilizando amostras de plasma humano processadas nos Maxwell® CSC e Maxwell® CSC 48 Instruments. Foram avaliadas as principais métricas, como a quantidade, a qualidade, a amplificabilidade, a reprodutibilidade e a contaminação cruzada de ccfDNA, para confirmar a fiabilidade e a adequação do ccfDNA extraído com o Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit para aplicações a jusante.

9.A. Quantidade e qualidade de ccfDNA

As amostras de plasma foram isoladas a partir do sangue de seis indivíduos, recolhidas em tubos de K₂EDTA ou dispositivos Streck Cell-Free DNA BCT®. O ccfDNA foi extraído de 1–4 ml de amostras de plasma com o Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit. A quantidade e a qualidade do ccfDNA foram avaliadas utilizando a análise TapeStation (Agilent Technologies, Inc.) de uma réplica biológica por condição, centrando-se na percentagem de ADN livre de células (cfDNA) e no tamanho do maior pico de ADN, que reflete a qualidade do fragmento. A percentagem de cfDNA refere-se ao rácio de fragmentos de ADN no intervalo de 50–700 pb em relação ao conteúdo total de ADN na amostra purificada, conforme determinado pela análise TapeStation. Este valor fornece uma medida do enriquecimento da amostra para o ccfDNA, que é, normalmente, mais pequeno em tamanho devido à respetiva origem no ADN fragmentado libertado após a morte celular.

A análise TapeStation indicou que a percentagem de cfDNA variava entre 76 e 93%, com os maiores tamanhos de pico entre 177 pb e 203 pb em todas as amostras de ccfDNA purificadas. Não se registaram diferenças significativas na proporção ou na qualidade do ccfDNA extraído do plasma recolhido em diferentes tubos anticoagulantes ou em diferentes volumes de introdução de amostras de plasma.

Tabela 3. A análise TapeStation do ccfDNA purificado mostra a percentagem de ADN livre de células e o maior tamanho de pico em vários volumes de introdução de amostras de plasma e anticoagulantes.

ID da amostra (anticoagulante)	Volume de introdução da amostra de plasma (ml)	Percentagem de ADN livre de células	Maior tamanho de pico (bp)
1 (K ₂ EDTA)	1,0	81	186
	1,5	79	181
	3,0	80	183
	4,0	79	183
2 (K ₂ EDTA)	1,0	81	177
	1,5	88	178
	3,0	84	179
	4,0	91	175
3 (K ₂ EDTA)	1,0	90	184
	1,5	90	187
	3,0	89	183
	4,0	88	185
4 (Streck)	1,0	93	195
	1,5	76	200
	3,0	89	193
	4,0	84	192
5 (Streck)	1,0	92	195
	1,5	92	197
	3,0	90	195
	4,0	89	194
6 (Streck)	1,0	89	183
	1,5	79	182
	3,0	86	203
	4,0	86	203

9.B. Amplificabilidade e inibição (Substâncias interferentes)

A amplificabilidade e a ausência de inibição do ccfDNA purificado foram avaliadas utilizando um ensaio de qPCR para amplificar um alvo de ADN de 75 pb e analisando os dados de qPCR para detetar qualquer inibição. O ccfDNA foi extraído em quadruplicado de cada uma das amostras de 4 ml de plasma humano recolhidas de seis indivíduos em tubos de K₂EDTA ou em dispositivos Streck Cell-Free DNA BCT®. Cada amostra de ccfDNA extraída foi analisada pelo ensaio de qPCR. Os valores médios do controlo interno positivo (IPC) $|\Delta C_q|$ foram calculados em relação ao padrão de qPCR cuja concentração era mais próxima da amostra de ccfDNA amplificada por qPCR para determinar o grau de inibição.

Os resultados de qPCR (Tabela 4) indicaram uma inibição mínima ou nula da amplificação, como é evidente pelos valores médios de IPC $|\Delta C_q| \leq 0,5$ para todas as amostras de ccfDNA purificadas.

Tabela 4. Avaliação da inibição por amplificação do ccfDNA extraído de amostras de 4 ml de plasma humano.

ID da amostra (anticoagulante)	IPC médio $ \Delta C_q $
1 (K ₂ EDTA)	0,2
2 (K ₂ EDTA)	0,2
3 (K ₂ EDTA)	0,4
4 (Streck)	0,5
5 (Streck)	0,3
6 (Streck)	0,3

9.C. Quantificação de ccfDNA por corante fluorescente e qPCR

A consistência da quantificação do ccfDNA foi avaliada através da comparação das concentrações de ccfDNA utilizando um método baseado em corantes fluorescentes específicos do ADN de cadeia dupla e um ensaio de qPCR que amplificou um alvo de ADN de 75 pb. Foram utilizadas para as análises amostras de ccfDNA extraídas em quadruplicado a partir de amostras de 4 ml de plasma humano recolhidas de seis indivíduos em tubos de K₂EDTA ou em dispositivos Streck Cell-Free DNA BCT®. Foram calculados os rácios entre a quantificação de ccfDNA com base na fluorescência e a quantificação de ccfDNA com base na qPCR.

Os resultados demonstraram uma forte correlação entre os dois métodos de quantificação, com rácios de concentração de ccfDNA entre 0,7 e 1,4 em todas as amostras.

Tabela 5. Comparação da concentração de ccfDNA utilizando métodos de quantificação baseados na fluorescência e na qPCR.

ID da amostra (anticoagulante)	Rácio de concentração fluorescência/qPCR
1 (K ₂ EDTA)	0,7
2 (K ₂ EDTA)	1,3
3 (K ₂ EDTA)	0,9
4 (Streck)	1,3
5 (Streck)	0,9
6 (Streck)	1,4

9.D. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade da extração de ccfDNA com o Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit foi avaliada através da análise do coeficiente de variação percentual (CV) intra e interexecuções para a colheita de ccfDNA. Utilizando 4 ml de plasma recolhido em anticoagulante K₂EDTA, o ccfDNA foi extraído através de três execuções de extração consecutivas com os Maxwell® CSC e Maxwell® CSC 48 Instruments. Cada extração originou uma colheita de 24 eluatos de ccfDNA. A colheita de ccfDNA foi quantificada utilizando um ensaio de qPCR que amplificou um alvo de ADN de 75 pb.

Os resultados mostraram que os valores de CV percentual intraexecução foram de 11% e 14% para o Maxwell® CSC Instrument e o Maxwell® CSC 48 Instrument, respetivamente. Os valores de CV percentuais interexecução foram de 5% para ambos os instrumentos.

Tabela 6. Variabilidade intra e interexecuções na colheita de ccfDNA.

Instrumento	Anticoagulante	Volume de introdução da amostra de plasma (ml)	Coefficiente de variação percentual intraexecução	Coefficiente de variação percentual interexecução
Maxwell® CSC	K ₂ EDTA	4	11%	5%
Maxwell® CSC 48	K ₂ EDTA	4	14%	5%

9.E. Contaminação cruzada

O potencial de contaminação cruzada durante a extração de ccfDNA utilizando o Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit foi avaliado através do processamento de amostras de plasma humano e bovino colocadas em posições alternadas na plataforma dos Maxwell® CSC e Maxwell® CSC 48 Instruments. Os eluatos de ccfDNA do plasma bovino foram analisados quanto à presença de qualquer ADN humano contaminante utilizando um ensaio de qPCR que amplificou um alvo de ADN de 75 pb específico do ser humano para determinar qualquer contaminação cruzada.

Quando as amostras de plasma humano foram processadas em posições na plataforma do Maxwell® Instrument adjacentes a amostras de plasma bovino, nenhum dos eluatos de ccfDNA bovino apresentou quantidades quantificáveis de ADN humano no ensaio de qPCR, confirmando a ausência de qualquer contaminação cruzada detetável.

9.F. Compatibilidade com sequenciação de nova geração

A compatibilidade do eluato de ccfDNA com os fluxos de trabalho de sequenciação de nova geração (NGS) foi avaliada através da preparação de bibliotecas de ccfDNA seguida da análise TapeStation. O ccfDNA foi extraído de amostras de plasma recolhidas em tubos de K₂EDTA ou em dispositivos Streck Cell-Free DNA BCT® utilizando o Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit com o Maxwell® CSC ou o Maxwell® CSC 48 Instrument. A preparação bem-sucedida da biblioteca foi determinada pela observação de um deslocamento característico do par de bases do adaptador na análise TapeStation.

Todas as bibliotecas de ccfDNA avaliadas demonstraram a deslocação esperada do par de bases do adaptador, confirmando o êxito da preparação da biblioteca NGS.

9.G. Compatibilidade com PCR digital

A compatibilidade dos eluatos de ccfDNA com o fluxo de trabalho de PCR digital (dPCR) foi avaliada utilizando um ensaio de PCR digital de gotículas. O estudo incluiu amostras de ccfDNA extraídas de plasma humano recolhidas em tubos de K₂EDTA e em dispositivos Streck Cell-Free DNA BCT[®], com volumes de introdução de amostras de 3 ml e 4 ml de plasma. Os eluatos de ccfDNA foram avaliados utilizando um ensaio de variação do número de cópias (gene PIK3CA) e foram registadas as contagens de gotículas.

Os resultados demonstraram uma amplificação bem-sucedida em todas as amostras de ccfDNA testadas, com contagens de gotículas superiores a 15 000 por reação.

10. Avaliação do desempenho clínico

O desempenho clínico do Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA Kit foi avaliado por um laboratório clínico externo utilizando amostras de plasma humano processadas com o Maxwell[®] CSC 48 Instrument.

No primeiro estudo, dois dispositivos de teste purificaram independentemente o ccfDNA a partir de amostras de 1,5 ml de plasma humano (n = 10) utilizando o Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA Kit e o método de purificação padrão utilizado pelo laboratório como referência. Os eluatos de ccfDNA resultantes foram analisados quanto ao fator Rhesus utilizando um ensaio com base na amplificação. O ccfDNA extraído de amostras de plasma humano utilizando o Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA Kit apresentou resultados esperados que estavam em concordância com os resultados obtidos com o ccfDNA extraído utilizando o método de referência do laboratório.

No segundo estudo, dois dispositivos de teste purificaram independentemente o ccfDNA a partir de amostras de 1,5 ml de plasma humano (n = 10) utilizando o Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA Kit. Os eluatos de ccfDNA purificados foram analisados quanto ao fator Rhesus utilizando um ensaio com base em amplificação, e foram obtidos resultados concordantes entre os dois dispositivos de teste.

11. Considerações a ter em conta ao trabalhar com ccfDNA

11.A. Preparação do plasma

Um potencial problema na purificação do ccfDNA é a presença de ADN genómico contaminante proveniente de glóbulos brancos lisados. Normalmente, o plasma é centrifugado duas vezes; a primeira centrifugação remove os glóbulos vermelhos e brancos e a segunda centrifugação remove os glóbulos brancos residuais. Se a amostra de sangue tiver sido incubada durante longos períodos à temperatura ambiente, ou se tiver sido congelada e descongelada antes do processamento, alguns glóbulos brancos podem ter sido lisados, libertando ADN genómico no plasma.

Se a amostra de plasma tiver sido congelada, é possível que esteja presente crioprecipitado após a descongelação. Embora o crioprecipitado não tenha qualquer efeito na purificação do ccfDNA com o Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA Kit, pode afetar a pipetagem do plasma. Para precipitar o crioprecipitado, centrifugue a amostra de plasma a $\geq 1\ 000 \times g$ durante ≥ 5 minutos antes do processamento.

11.B. Recomendações para a quantificação de ccfDNA

A baixa concentração e a natureza fragmentada do ccfDNA apresentam desafios únicos. No plasma de indivíduos humanos saudáveis, são típicas colheitas de 5–30 ng de ccfDNA por mililitro de plasma. A maioria dos fragmentos de ccfDNA tem, aproximadamente, 160–200 pb, com fragmentos adicionais de, aproximadamente, 340 pb e 510 pb.

Quantificação UV

A determinação exata da concentração de ccfDNA utilizando a absorvência de 260 nm é difícil devido à baixa concentração. Alguns produtos utilizam um ARN transportador para melhorar a purificação do ccfDNA. O ARN transportador é muito mais abundante do que o ccfDNA e copurifica-se. Isto pode originar um valor falso de A_{260} e concentrações aparentes de ccfDNA drasticamente mais elevadas. Para uma quantificação exata, utilize corantes fluorescentes ou PCR.

Quantificação baseada na fluorescência

A elevada sensibilidade dos corantes específicos para ADN de cadeia dupla torna-os uma melhor opção para quantificar ccfDNA, mas levantam duas questões. A primeira envolve o ARN transportador. Embora os corantes específicos para ADN de cadeia dupla tenham uma especificidade muito maior para o ADN do que para o ARN, os níveis elevados de ARN transportador noutros kits de ccfDNA podem inflacionar os valores da unidade de fluorescência relativa (RFU), fazendo com que as concentrações de ccfDNA pareçam mais elevadas do que as respetivas concentrações reais.

Um segundo fator é o facto de os padrões utilizados com corantes fluorescentes serem tipicamente ADN genómico ou Lambda de elevado peso molecular. O ccfDNA é altamente fragmentado e tem um peso molecular relativamente baixo. Por conseguinte, não se liga a corantes fluorescentes tão eficazmente como o ADN de elevado peso molecular, o que leva a concentrações aparentes mais baixas. Se possível, utilize padrões de ADN de menor peso molecular para obter uma quantificação mais exata.

Quantificação baseada na amplificação

Tanto a qPCR como a PCR digital proporcionam a quantificação mais exata do ccfDNA. Para além da sensibilidade, a quantificação baseada na amplificação pode indicar a adequação das amostras para aplicações a jusante baseadas na amplificação.

12. Resolução de problemas

Contacte a filial ou o distribuidor local da Promega para obter respostas a questões não abordadas neste manual. As informações de contacto estão disponíveis em: www.promega.com. E-mail: techserv@promega.com

Sintomas	Causas e observações
O instrumento não consegue agarrar os êmbolos	Certifique-se de que é utilizado um kit de química específico para o Maxwell® CSC; os êmbolos para os kits Maxwell® CSC são específicos para os Maxwell® Instruments suportados (consulte a Tabela 1).
Baixa colheita de ccfDNA	<p>O Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit pode aceitar uma amostra máxima de 4 ml de plasma. Repita a extração utilizando até 4 ml de plasma.</p> <p>Se for utilizado menos de 1 ml de plasma, a recuperação de ccfDNA pode ser afetada negativamente.</p> <p>Confirme que foi adicionado o volume correto de solução de proteinase K (PK2) ao poço n.º 4 do cartucho. Repita a extração depois de distribuir 10 µl de solução de proteinase K (PK2) no poço n.º 4.</p> <p>As colheitas podem ser reduzidas se eluir em menos de 50 µl de Elution Buffer (RCFD). Repita a extração utilizando 50 µl de Elution Buffer (RCFD).</p> <p>O Elution Buffer (RCFD) fornecido é essencial para uma recuperação eficaz de ccfDNA. Não substitua o Elution Buffer (RCFD) por tampões de eluição alternativos. Repita a extração utilizando o Elution Buffer (RCFD).</p> <p>Confirme que o plasma foi transferido para os poços corretos do Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge (consulte a Tabela 2 e a Figura 1 na Secção 6).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Para volumes de introdução de plasma de 1,0–1,5 ml, transfira todo o plasma para o poço n.º 1. • Para volumes de introdução de plasma de 1,5–3,0 ml, divida o volume de plasma igualmente entre os poços n.º 1 e n.º 3. • Para volumes de introdução de plasma de 3,0 ml–4,0 ml, adicione volumes iguais de plasma aos poços n.º 1, n.º 2 e n.º 3.
Contaminação de ADN genómico	A preparação de plasma contém glóbulos brancos lisados. Consulte as secções 5 e 11. A para obter recomendações sobre a preparação de amostras de plasma a partir de sangue total.

Qualquer incidente grave que ocorra relacionado com o dispositivo que tenha conduzido, 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.

13. Produtos relacionados

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
RSC/CSC Plungers	50/pacote	AS1331
Elution Tubes (0,5 ml)	50/pacote	AS6201
Elution Magnet, 16 Posições	1 de cada	AS4017
Elution Magnet, 24 Posições	1 de cada	AS4018

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

Kits Maxwell® CSC Reagent

Visite www.promega.com para obter uma lista dos kits de extração Maxwell® CSC disponíveis.

© 2025 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Maxwell é uma marca comercial registada da Promega Corporation.

Cell-Free DNA BCT é uma marca comercial registada da Streck LLC.

Os produtos podem estar cobertos por patentes pendentes ou por patentes emitidas ou podem ter algumas limitações. Visite o nosso website 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.