

MANUALE TECNICO

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit

Istruzioni per l'uso del prodotto
AS1580

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

Nota: per utilizzare il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit, il metodo Maxwell® CSC Rapid ccfDNA deve essere caricato sul Maxwell® CSC Instrument o Maxwell® CSC 48 Instrument.



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germania



ISTRUZIONI PER
L'USO DEL PRODOTTO
AS1580



Maxwell® CSC Rapid ccfDNA 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. Preparazione dei campioni di plasma	5
6. Preparazione delle Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges.....	6
7. Impostazione ed esecuzione del Maxwell® Instrument	9
8. Post-purificazione	11
9. Valutazione delle prestazioni analitiche	11
9.A. Quantità e qualità del ccfDNA.....	12
9.B. Amplificabilità e inibizione (sostanze interferenti).....	14
9.C. Quantificazione del ccfDNA tramite colorante fluorescente e qPCR	15
9.D. Riproducibilità	15
9.E. Contaminazione crociata	16
9.F. Compatibilità con il Next-Generation Sequencing	16
9.G. Compatibilità con la PCR digitale	16
10. Valutazione delle prestazioni cliniche	17
11. Considerazioni quando si lavora con il ccfDNA	17
11.A. Preparazione del plasma	17
11.B. Raccomandazioni per la quantificazione del ccfDNA	18
12. Risoluzione dei problemi.....	19
13. Prodotti correlati	20

Il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit è disponibile solo in alcuni paesi.

1. Descrizione

Il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit viene utilizzato con i Maxwell® Instruments specificati nella Tabella 1 e fornisce un metodo semplice per l'estrazione efficiente e automatizzata del DNA circolante libero da cellule (ccfDNA) da 1–4 ml di campioni di plasma umano. I Maxwell® CSC Instruments sono progettati per l'uso con cartucce di reagenti predefinite e metodi di estrazione preprogrammati, massimizzando la semplicità e la praticità. Il metodo Maxwell® CSC Rapid ccfDNA può elaborare da uno fino al numero massimo di campioni supportati dai Maxwell® CSC Instruments in meno di 30 minuti. Il ccfDNA estratto può essere utilizzato direttamente in svariate applicazioni a valle, ad esempio la PCR digitale e il Next-Generation Sequencing (NGS).

Tabella 1. Strumenti supportati.

Strumento	Cat.#	Manuale tecnico	Numero massimo di campioni
Maxwell® CSC	AS6000	TM457	16
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623	48

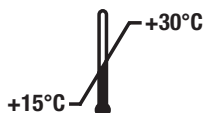
Principio del metodo

Il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit purifica il ccfDNA dai campioni di plasma utilizzando particelle paramagnetiche, che forniscono una fase solida mobile che ottimizza la cattura del campione, il lavaggio e la purificazione del ccfDNA. I Maxwell® Instruments sono strumenti per la gestione di particelle magnetiche che legano efficacemente il ccfDNA alle particelle paramagnetiche nelle prime tre camere di una cartuccia preriempita. I campioni vengono processati attraverso una serie di lavaggi prima che il ccfDNA venga eluito. Questo approccio alla cattura magnetica evita problemi frequenti quali puntali ostruiti o trasferimenti di reagente parziali, che portano a un'elaborazione della purificazione non ottimale mediante altri sistemi automatizzati comunemente usati.

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

PRODOTTO	QUANTITÀ	CAT. #
Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit	48 prep	AS1580

Per uso diagnostico in vitro. Esclusivamente ad uso professionale. Contiene reagenti sufficienti per 48 isolamenti automatici di ccfDNA da campioni di plasma. Le cartucce sono esclusivamente mono-uso.



Include:

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

Condizioni di conservazione: conservare il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit a una temperatura da +15°C a +30°C.



Informazioni sulla sicurezza: per informazioni dettagliate sulla sicurezza, consultare la scheda dati di sicurezza (SDS). Attenersi alle linee guida della struttura per la gestione e lo smaltimento di tutti i rifiuti chimici utilizzati con questo sistema.



Le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (CSCS) sono progettate per essere utilizzate con sostanze potenzialmente infettive. Indossare idonee protezioni (p. es., guanti e occhiali di sicurezza) nel maneggiare le sostanze infettive. Attenersi alle linee guida della propria struttura per la gestione e lo smaltimento di tutte le sostanze infettive utilizzate con questo sistema.

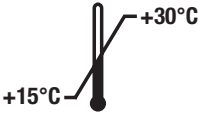


Attenzione: maneggiare le cartucce con attenzione; i bordi del sigillo possono essere taglienti.

Informazioni aggiuntive: i componenti del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit sono qualificati e comprovati per funzionare insieme. Non mescolare i componenti di un kit tra lotti di kit differenti. Usare solo i componenti forniti nel kit. Per ulteriori informazioni sulla sicurezza, vedere la scheda di sicurezza (Safety Data Sheet) disponibile all'indirizzo:

www.promega.com

Legenda dei simboli

Simbolo	Spiegazione	Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Rappresentante autorizzato
	Conservare a una temperatura da +15°C a +30°C.		Fabbricante
	Attenzione		Irritante
	Rischio per la salute		Contenuto sufficiente per "n" test
	Conformità alle normative europee		Avvertenza. Rischio biologico.
	Avvertenza. Pericolo di schiacciamento.		Numero catalogo
	Numero lotto		Non riutilizzare

3. Finalità prevista/uso previsto del prodotto

Il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit è destinato all'uso come dispositivo medico-diagnostico in vitro (IVD) per l'isolamento automatico del DNA circolante libero da cellule (ccfDNA) da campioni di plasma umano intero, in combinazione con i Maxwell® CSC Instruments e il metodo Maxwell® CSC Rapid ccfDNA. Il ccfDNA purificato è adatto per l'impiego in analisi diagnostiche in vitro basate sull'amplificazione, compresa la PCR digitale.

Il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit è previsto per un impiego ad una temperatura da 15°C a 30°C. L'impiego al di fuori di questi valori può comportare risultati non ottimali.

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

4. Limitazioni all'utilizzo del prodotto

Le prestazioni del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit sono state valutate con campioni di plasma umano preparati da sangue intero raccolto in provette di raccolta del sangue Streck Cell-Free DNA BCT o con anticoagulante K₂EDTA. L'utente è responsabile della convalida dell'uso del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit per la purificazione del ccfDNA dal plasma raccolto in altre provette di raccolta del sangue.

L'idoneità dell'acido nucleico purificato con Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit per l'uso nel Next-Generation Sequencing (NGS) è stata dimostrata durante lo sviluppo del prodotto ma non è stata convalidata.

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

5. Preparazione dei campioni di plasma

Fornitura materiali a cura dell'utente

- Sangue intero o plasma
- Centrifuga da banco

Per il sangue intero raccolto in provette con EDTA, il sangue deve essere trattato immediatamente dopo il prelievo o conservato da +2°C a +10°C fino alla preparazione del plasma. Centrifugare il sangue intero da provette con EDTA per ≥10 minuti a ≥2.000 × g per pellettizzare i globuli rossi e bianchi. Per i dispositivi Streck Cell-Free DNA BCT®, seguire le istruzioni del fabbricante. Dopo aver centrifugato per la prima volta le provette di raccolta del sangue Streck Cell-Free DNA BCT® o con EDTA, utilizzare una pipetta per rimuovere con attenzione la maggior quantità possibile di plasma senza disturbare il buffy coat e trasferirlo in una nuova provetta. Per garantire che non vengano trasferiti globuli bianchi, centrifugare il plasma una seconda volta per ≥10 minuti a ≥2.000 × g e trasferire il surnatante in una provetta pulita.

Conservare il plasma da +2°C a +10°C fino a 1 settimana. Per tempi di conservazione più lunghi, conservare il plasma da -30°C a -10°C (o a una temperatura inferiore a -65°C). Evitare di esporre il plasma a cicli di congelamento e scongelamento. Vedere la Sezione 11.A per considerazioni sull'uso di plasma congelato.

6. Preparazione delle Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges

1. Cambiare guanti prima di maneggiare Maxwell® CSC Cartridges, CSC/RSC Plungers ed Elution Tubes (0,5 ml). Posizionare le cartucce da usare nei vassoi Maxwell® CSC/RSC con la camera n.1 (la prima delle camere più grandi della cartuccia) rivolta in modo che sia opposta alle provette di eluizione. Premere sulla cartuccia fino a quando non scatta in posizione. Staccare delicatamente il sigillo in modo che venga completamente rimosso dalla parte superiore della cartuccia. Prima di posizionare le cartucce nello strumento assicurarsi che siano stati rimossi il nastro sigillante e qualunque residuo di adesivo.



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

2. A seconda del volume totale del campione di plasma, trasferire il plasma solo alla camera n.1 (la prima delle camere più grandi), solo alle camere n.1 e n.3 (la prima e la terza delle più grandi) o alle camere n.1, n.2 e n.3 (le tre più grandi) della cartuccia Maxwell® CSC Rapid ccfDNA come indicato nella Tabella 2. Cambiare i puntali tra campioni di plasma diversi per evitare la contaminazione crociata.

Tabella 2. Trasferimento dei campioni di plasma alle diverse camere della Maxwell® CSC Cartridge in base al volume di ingresso del campione.

Volume campione (ml)	Conservare le presenti istruzioni
da 1,0 ml a 1,5 ml plasma	Aggiungere il plasma solo alla camera n.1. Vedere la Figura 1, Riquadro A.
da >1,5 ml a ≤3,0 ml di plasma	Aggiungere volumi uguali di plasma alle camere n.1 e n.3. Vedere la Figura 1, Riquadro B.
da 3,0 ml a 4,0 ml di plasma	Aggiungere volumi uguali di plasma alle camere n.1, n.2 e n.3. Vedere la Figura 1, Riquadro C.

Note:

- **Non dispensare più di 1,5 ml di plasma per camera.**
- **Con volumi di ingresso del plasma di 1,0–1,5 ml, l'intero campione di plasma deve essere caricato solo nella camera n.1.** Il caricamento di plasma nelle camere n.2 o n.3 influisce negativamente sul recupero di ccfDNA.
- **Con volumi di ingresso del plasma di 1,5–3,0 ml, il plasma deve essere caricato solo nelle camere n.1 e n.3.** Il caricamento di plasma in qualsiasi altra configurazione delle camere (ad esempio, nelle camere n.2 e n.3 oppure nelle camere n.1 e n.2) influisce negativamente sul recupero di ccfDNA.

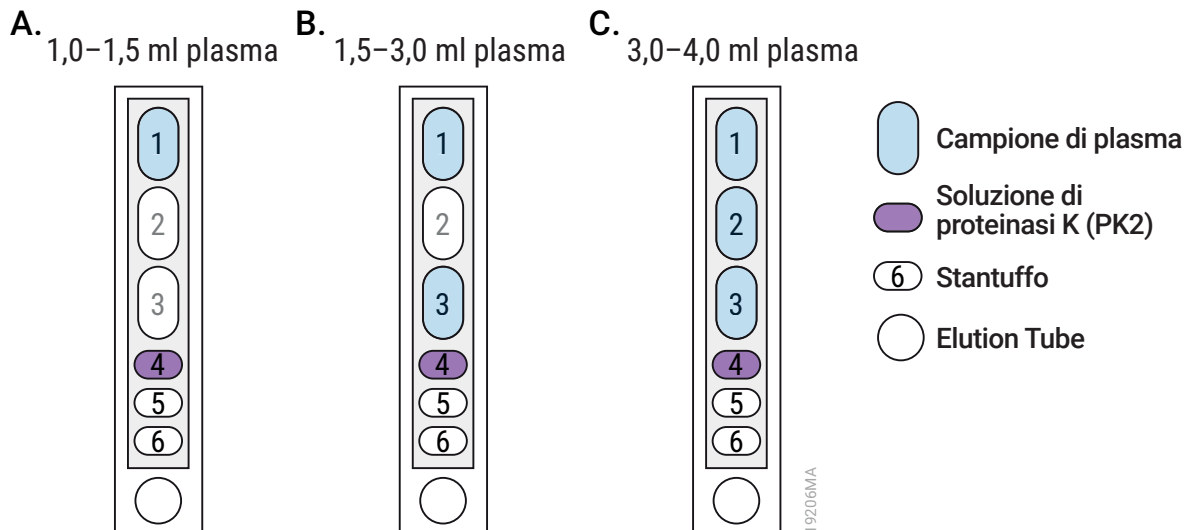


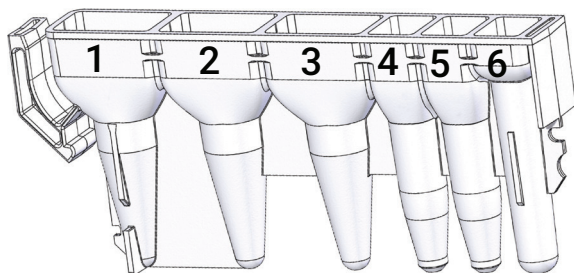
Figura 1. Il trasferimento dei campioni di plasma alle diverse camere della Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge è basato sul volume di ingresso del campione. Per i campioni di plasma di 1,0–1,5 ml, trasferire l'intero campione nella camera n.1 (**Riquadro A**). Per i campioni di plasma di 1,5–3,0 ml, trasferire volumi uguali di plasma alle due camere n.1 e n.3 (**Riquadro B**). Per i campioni di plasma di 3,0–4,0 ml, trasferire volumi uguali di plasma alle camere n.1, n.2 e n.3 (**Riquadro C**). Dispensare 10 µl di soluzione di proteinasi K (PK2) nella camera n.4. Aggiungere 50 µl di Elution Buffer (RCFD) alla Elution Tube (rappresentata dal cerchio sulla parte inferiore di ciascun riquadro). Posizionare uno stantuffo nella camera n.6.

3. Dispensare 10 µl di soluzione di proteinasi K (PK2) nella camera n.4.
4. Posizionare uno stantuffo nella camera n.6 di ciascuna cartuccia.
5. Porre nell'apposita posizione una Elution Tube vuota per ciascuna cartuccia nel vassoio. Aggiungere 50 µl di Elution Buffer (RCFD) sul fondo di ciascuna Elution Tube.
6. Procedere alla Sezione 7, Impostazione ed esecuzione del Maxwell® Instrument.

Note:

- a. 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 o salvietta battericida, oppure strofinando e lavando nuovamente con acqua. Non usare candeggina su nessuna parte del Maxwell® Instrument.
- b. Usare esclusivamente le Elution Tubes da 0,5 ml in dotazione nel kit, perché altre provette potrebbero essere incompatibili con il Maxwell® Instrument.
- c. L'Elution Buffer (RCFD) fornito è essenziale per un recupero efficiente del ccfDNA. Non sostituire l'Elution Buffer (RCFD) con tamponi di eluizione alternativi. L'uso di tamponi di eluizione alternativi influisce negativamente sul recupero di ccfDNA.
- d. Concentrazioni più elevate di ccfDNA possono essere ottenute con meno di 50 µl di Elution Buffer (RCFD), ma la resa totale potrebbe essere ridotta.

6. Preparazione delle Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (continua)



19207TA

Componenti aggiunti dall'utente alle camere:

1. Campione di plasma (per i dettagli, vedere la Tabella 2 e la Figura 1).
- oppure**
- 1.,3. Campione di plasma
- oppure**
- 1.,2.,3. Campione di plasma
4. Soluzione di proteinasi K (PK2)
6. CSC/RSC Plunger

Figura 2. Maxwell® CSC Cartridge. Il campione di plasma viene aggiunto alla camera n.1 (1,0–1,5 ml di campione), alle camere n.1 e n.3 (1,5–3,0 ml di campione), o alle camere n.1, n.2 e n.3 (3,0–4,0 ml di campione), a seconda del volume del campione; 10 µl di soluzione di proteinasi K (PK2) vengono dispensati nella camera n.4 e uno stantuffo viene aggiunto alla camera n.6.



19208TA

Figura 3. Preparazione e allestimento dei vassoi. Elution Buffer (RCFD) viene aggiunto alle provette di eluizione come indicato. Gli stantuffi sono nella camera n.6 della cartuccia. Il vassoio illustrato è quello del Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000).

7. Impostazione ed esecuzione del Maxwell® Instrument

Per informazioni dettagliate, consultare il manuale operativo specifico del Maxwell® CSC Instrument in uso. Vedere la Tabella 1.

1. Accendere il Maxwell® Instrument e il tablet PC. Accedere al tablet PC e avviare il software Maxwell® CSC IVD-mode 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 di Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit e selezionare **OK** per selezionare automaticamente il metodo da eseguire (Figura 4).

Nota: il codice a barre del metodo di Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit è necessario per la purificazione del ccfDNA con i Maxwell® CSC Instruments. L'etichetta del kit contiene due codici a barre. Il codice a barre del metodo è indicato nella Figura 4. Se il codice a barre non è leggibile, contattare i Promega Technical Services.



Figura 4. Etichetta del kit con l'indicazione del codice a barre da leggere. Il codice a barre da leggere per avviare un ciclo di purificazione è indicato nella casella blu nell'angolo in alto a destra dell'etichetta del kit.

4. Nella schermata "Impostazioni cartuccia", confermare che il metodo Maxwell® CSC Rapid ccfDNA sia visualizzato in cima. Selezionare 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 selezionare il pulsante **Procedi** per continuare.

Nota: con il Maxwell® CSC 48 Instrument, selezionare o deselezionare le posizioni delle cartucce su ciascun vassoio utilizzando il pulsante **Anteriore** o **Posteriore**.

7. Impostazione ed esecuzione del Maxwell® Instrument (continua)

5. Una volta aperto lo sportello, confermare che tutte le voci della lista di controllo estrazione siano state eseguite. Verificare che i campioni di plasma siano stati aggiunti alle camere appropriate delle cartucce, che la soluzione di proteinasi K (PK2) sia stata aggiunta alla camera n.4 della cartuccia, che gli stantuffi siano nella camera n.6, che le cartucce siano caricate sullo strumento e che siano presenti le provette di eluizione stappate con Elution Buffer (RCFD). Trasferire i vassoi contenenti le cartucce preparate sulla piattaforma del Maxwell® Instrument.

Inserimento dei vassoi Maxwell®: tenere il vassoio dai lati per evitare di spostare le cartucce dal vassoio. Accertarsi che il vassoio sia posizionato nel Maxwell® Instrument con le provette di eluizione più vicine 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. Selezionare il pulsante **Avvia** per iniziare il ciclo di estrazione. La piattaforma rientra e lo sportello si chiude.



Avvertenza: pericolo di schiacciamento.

Nota: se si usa un Maxwell® Instrument a 48 posizioni ed è stato abilitato il Vision System, i vassoi saranno letti quando la piattaforma si ritrae. Qualsiasi errore nella configurazione dei vassoi (p. es., stantuffi non nella camera n.6, provette di eluizione non presenti e aperte) causerà il ritorno del software alla schermata "Impostazioni cartuccia" e le posizioni problematiche saranno contrassegnate con un punto esclamativo racchiuso in un cerchio rosso. Selezionare il punto esclamativo per visualizzare la descrizione dell'errore e risolvere tutti gli stati di errore. Selezionare di nuovo il pulsante **Avvia** per ripetere la lettura dei vassoi e iniziare il ciclo di estrazione.

7. Il Maxwell® Instrument inizierà immediatamente il ciclo di purificazione. La schermata visualizzerà i passaggi man mano che vengono eseguiti e una stima del tempo rimanente per la fine del ciclo.

Note:

- a. Selezionando 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 del Maxwell® Instrument. Se nella barra sono presenti degli stantuffi, 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.6 della cartuccia al termine del ciclo. Se gli stantuffi non sono stati rimossi dalla barra, seguire le istruzioni del manuale tecnico del Maxwell® Instrument in uso (vedere la Tabella 1) per eseguire un processo di **Rimozione stantuffi** e cercare di scaricare gli stantuffi.
10. Rimuovere i vassoi dallo strumento subito dopo il ciclo per evitare l'evaporazione degli eluiti. Rimuovere le provette di eluizione contenenti il ccfDNA e tapparle.
Assicurarsi che i campioni di acido nucleico purificati vengano rimossi dallo strumento prima di eseguire un protocollo di igienizzazione UV per evitare di danneggiare l'acido nucleico.
11. Rimuovere le cartucce e gli stantuffi dai vassoi Maxwell®. Smaltire come rifiuto pericoloso secondo le procedure della propria struttura. Non riutilizzare Maxwell® CSC Cartridges, CSC/RSC Plungers o Elution Tubes.



8. Post-purificazione

Assicurarsi che la resa del campione di ccfDNA purificato sia conforme ai requisiti di ingresso dell'analisi diagnostica a valle prima di impiegarlo in tale analisi. Se i campioni di ccfDNA purificato non vengono elaborati immediatamente, conservare i campioni di ccfDNA a 4°C per massimo 7 giorni. Per la conservazione a lungo termine, congelare a -20°C o a -70°C e oltre. Consultare le istruzioni per le applicazioni a valle per la conservazione di campioni ccfDNA specifica e le raccomandazioni per la manipolazione.

9. Valutazione delle prestazioni analitiche

Le prestazioni analitiche di Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit sono state valutate utilizzando campioni di plasma umano processati sui Maxwell® CSC Instruments e Maxwell® CSC 48 Instruments. Sono stati valutati parametri chiave come la quantità, la qualità, l'amplificabilità, la riproducibilità e la contaminazione crociata del ccfDNA per confermare l'affidabilità e l'idoneità del ccfDNA estratto con il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit per le applicazioni a valle.

9.A. Quantità e qualità del ccfDNA

I campioni di plasma sono stati isolati dal sangue di sei individui raccolto in provette con K₂EDTA o in dispositivi Streck Cell-Free DNA BCT®. Il ccfDNA è stato estratto da campioni di plasma da 1–4 ml con il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit. La quantità e la qualità del ccfDNA sono state valutate utilizzando l'analisi TapeStation (Agilent Technologies, Inc.) di un replicato biologico per ciascuna condizione, concentrandosi sulla percentuale di DNA libero da cellule (cfDNA) e sulla dimensione del picco di DNA più grande, che riflette la qualità del frammento. La percentuale di cfDNA si riferisce al rapporto tra i frammenti di DNA nell'intervallo 50–700 bp rispetto al contenuto totale di DNA nel campione purificato, come determinato dall'analisi TapeStation. Questo valore fornisce una misura dell'arricchimento del campione per il ccfDNA, che è tipicamente più piccolo a causa della sua origine da DNA frammentato rilasciato dopo la morte cellulare.

L'analisi TapeStation ha indicato che la percentuale di cfDNA era del 76–93%, con dimensioni dei picchi più grandi tra 177 bp e 203 bp in tutti i campioni di ccfDNA purificati. Non sono state riscontrate differenze significative nella proporzione o nella qualità del ccfDNA estratto dal plasma raccolto in provette con anticoagulante diverse o in volumi di ingresso del campione di plasma diversi.

Tabella 3. Analisi TapeStation del ccfDNA purificato che mostra la percentuale di DNA libero da cellule e la dimensione del picco più grande tra vari volumi di ingresso del campione di plasma e vari anticoagulanti.

ID campione (anticoagulante)	Volume immesso del campione di plasma (ml)	Percentuale di DNA libero da cellule	Dimensione picco più grande (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

ID campione (anticoagulante)	Volume immesso del campione di plasma (ml)	Percentuale di DNA libero da cellule	Dimensione picco più grande (bp)
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. Amplificabilità e inibizione (sostanze interferenti)

L'amplificabilità del ccfDNA purificato e l'assenza di inibizione sono state valutate utilizzando un'analisi qPCR per l'amplificazione di un target di DNA di 75 bp e analizzando i dati della qPCR per verificare l'eventuale inibizione. Il ccfDNA è stato estratto in quadruplo da ciascuno dei campioni da 4 ml di plasma umano raccolti da sei individui in provette con K₂EDTA o in dispositivi Streck Cell-Free DNA BCT®. Ciascun campione di ccfDNA estratto è stato analizzato con analisi qPCR. I valori medi del controllo interno positivo (IPC) $|\Delta C_q|$ sono stati calcolati rispetto allo standard qPCR la cui concentrazione era più vicina a quella del campione di ccfDNA amplificato mediante qPCR per determinare l'entità dell'inibizione.

I risultati qPCR (Tabella 4) hanno indicato un'inibizione dell'amplificazione minima o nulla, come evidenziato dai valori medi dell'IPC $|\Delta C_q| \leq 0,5$ per tutti i campioni di ccfDNA purificato.

Tabella 4. Valutazione dell'inibizione mediante amplificazione del ccfDNA estratto da campioni di plasma umano da 4 ml.

ID campione (anticoagulante)	Valore medio IPC $ \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. Quantificazione del ccfDNA tramite colorante fluorescente e qPCR

La coerenza della quantificazione del ccfDNA è stata valutata confrontando le concentrazioni di ccfDNA utilizzando un metodo basato su un colorante fluorescente specifico per il DNA a doppio filamento e un'analisi qPCR che ha amplificato un target di DNA di 75 bp. I campioni di ccfDNA estratti in quadruplo da ciascuno dei campioni da 4 ml di plasma umano raccolti da sei individui in provette con K₂EDTA o in dispositivi Streck Cell-Free DNA BCT® sono stati utilizzati per le analisi. Sono stati calcolati i rapporti tra la quantificazione del ccfDNA basata sulla fluorescenza e la quantificazione del ccfDNA basata sulla qPCR.

I risultati hanno dimostrato una forte correlazione tra i due metodi di quantificazione, con rapporti di concentrazione del ccfDNA compresi tra 0,7 e 1,4 in tutti i campioni.

Tabella 5. Confronto della concentrazione di ccfDNA con metodi di quantificazione basati sulla fluorescenza e sulla qPCR.

ID campione (anticoagulante)	Rapporto concentrazione fluorescenza/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. Riproducibilità

La riproducibilità dell'estrazione di ccfDNA con Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit è stata valutata analizzando il coefficiente di variazione (CV) percentuale all'interno di un ciclo e tra più cicli per la resa di ccfDNA. Utilizzando 4 ml di plasma raccolti in anticoagulante K₂EDTA, il ccfDNA è stato estratto con tre cicli di estrazione consecutivi sia con il Maxwell® CSC Instrument che con il Maxwell® CSC 48 Instrument. Ogni estrazione ha prodotto 24 eluiti di ccfDNA. La resa di ccfDNA è stata quantificata utilizzando un'analisi qPCR che ha amplificato un target di DNA di 75 bp.

I risultati hanno mostrato che i valori del CV percentuale all'interno del ciclo sono stati dell'11% e del 14% rispettivamente per il Maxwell® CSC Instrument e il Maxwell® CSC 48 Instrument. I valori del CV tra più cicli sono stati del 5% per entrambi gli strumenti.

Tabella 6. Variabilità nella resa di ccfDNA all'interno del ciclo e tra più cicli.

Strumento	Anticoagulante	Volume immesso del campione di plasma (ml)	Coefficiente di variazione percentuale all'interno del ciclo	Coefficiente di variazione percentuale tra cicli
Maxwell® CSC	K ₂ EDTA	4	11%	5%
Maxwell® CSC 48	K ₂ EDTA	4	14%	5%

9.E. Contaminazione crociata

Il potenziale di contaminazione crociata durante l'estrazione del ccfdDNA con il Maxwell® CSC Rapid ccfdDNA Kit è stato valutato analizzando campioni di plasma umano e bovino collocati in posizioni del vassoio alternate sui Maxwell® CSC Instruments e Maxwell® CSC 48 Instruments. Gli eluiti di ccfdDNA dal plasma bovino sono stati analizzati per verificare la presenza di DNA umano contaminante utilizzando un'analisi qPCR che ha amplificato un target di DNA specifico per l'essere umano di 75 bp per determinare qualsiasi contaminazione crociata.

Quando i campioni di plasma umano sono stati processati in posizioni del vassoio del Maxwell® Instrument adiacenti ai campioni di plasma bovino, nessuno degli eluiti di ccfdDNA bovino ha mostrato quantità quantificabili di DNA umano nel test qPCR, confermando l'assenza di qualsiasi contaminazione crociata rilevabile.

9.F. Compatibilità con il Next-Generation Sequencing

La compatibilità del ccfdDNA eluito con i flussi di lavoro del Next-Generation Sequencing (NGS) è stata valutata tramite preparazione della libreria ccfdDNA seguita da analisi TapeStation. Il ccfdDNA è stato estratto dai campioni di plasma raccolti in provette con K₂EDTA o dispositivi Streck Cell-Free DNA BCT® utilizzando il Maxwell® CSC Rapid ccfdDNA Kit con il Maxwell® CSC Instrument o il Maxwell® CSC 48 Instrument. La riuscita della preparazione della libreria è stata determinata osservando il caratteristico spostamento in coppie di basi dovuto agli adattatori nell'analisi TapeStation.

Tutte le librerie di ccfdDNA valutate hanno mostrato il previsto spostamento delle coppie di basi dovuto agli adattatori, confermando il successo della preparazione delle librerie NGS.

9.G. Compatibilità con la PCR digitale

La compatibilità degli eluiti di ccfdDNA con il flusso di lavoro della PCR digitale (dPCR) è stata valutata utilizzando un'analisi droplet digital PCR. Lo studio ha incluso campioni di ccfdDNA estratti da plasma umano raccolti sia in provette K₂EDTA che in dispositivi Streck Cell-Free DNA BCT®, con volumi di ingresso del campione di plasma di 3 ml e 4 ml. Gli eluiti di ccfdDNA sono stati valutati utilizzando un'analisi della variazione del numero di copie (gene PIK3CA) e sono stati registrati i conteggi di droplet.

I risultati hanno dimostrato il successo dell'amplificazione in tutti i campioni di ccfdDNA testati, con conteggi di droplet superiori a 15.000 per reazione.

10. Valutazione delle prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche di Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit sono state valutate da un laboratorio clinico esterno utilizzando campioni di plasma umano processati sul Maxwell® CSC 48 Instrument.

Nel primo studio, due tester hanno purificato in modo indipendente il ccfDNA da campioni di plasma umano da 1,5 ml (n = 10) utilizzando sia il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit che il metodo di purificazione standard utilizzato dal laboratorio come riferimento. Gli eluiti di ccfDNA risultanti sono stati analizzati per il fattore Rhesus utilizzando un'analisi basata sull'amplificazione. Il ccfDNA estratto da campioni di plasma umano utilizzando il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit ha mostrato risultati attesi e concordanti con i risultati ottenuti quando il ccfDNA è stato estratto utilizzando il metodo di riferimento del laboratorio.

Nel secondo studio, due tester hanno purificato in modo indipendente il ccfDNA da campioni di plasma umano da 1,5 ml (n = 10) utilizzando il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit. Gli eluiti di ccfDNA purificato sono stati analizzati per il fattore Rhesus utilizzando un'analisi basata sull'amplificazione e i risultati ottenuti dai due tester sono stati concordanti.

11. Considerazioni quando si lavora con il ccfDNA

11.A. Preparazione del plasma

Un potenziale problema nella purificazione del ccfDNA è rappresentato dalla presenza di DNA genomico contaminante proveniente da globuli bianchi lisati. Il plasma viene in genere centrifugato due volte; la prima centrifuga rimuove i globuli rossi e bianchi, mentre la seconda centrifuga rimuove eventuali globuli bianchi residui. Se il campione di sangue è stato incubato per lunghi periodi a temperatura ambiente o è stato congelato e scongelato prima di essere processato, alcuni globuli bianchi potrebbero essere lisati e aver rilasciato del DNA genomico nel plasma.

Se il campione di plasma è stato congelato, dopo lo scongelamento potrebbe essere presente del crioprecipitato. Sebbene il crioprecipitato non abbia alcun effetto sulla purificazione del ccfDNA con il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit, può influenzare il pipettaggio del plasma. Per pellettizzare il crioprecipitato, centrifugare il campione di plasma a $\geq 1.000 \times g$ per ≥ 5 minuti prima dell'elaborazione.

11.B. Raccomandazioni per la quantificazione del ccfDNA

La bassa concentrazione e la natura frammentata del ccfDNA pongono difficoltà specifiche. Nel plasma proveniente da individui sani, sono comuni rese di 5–30 ng di ccfDNA per millilitro di plasma. La maggior parte dei frammenti di ccfDNA è di circa 160–200 bp, con frammenti aggiuntivi di circa 340 bp e 510 bp.

Quantificazione UV

La determinazione accurata della concentrazione di ccfDNA tramite assorbanza a 260 nm è difficile a causa della bassa concentrazione. Alcuni prodotti utilizzano un carrier RNA per migliorare la purificazione del ccfDNA. Il carrier RNA è molto più abbondante del ccfDNA e copurifica. Ciò può dare un falso valore A_{260} e concentrazioni apparenti di ccfDNA molto più elevate. Per una quantificazione accurata, utilizzare coloranti fluorescenti o PCR.

Quantificazione basata sulla fluorescenza

L'elevata sensibilità dei coloranti specifici per il DNA a doppio filamento li rende più adatti alla quantificazione del ccfDNA, ma vi sono due aspetti problematici. Il primo riguarda il carrier RNA. Sebbene i coloranti specifici per il DNA a doppio filamento abbiano una specificità molto maggiore per il DNA rispetto all'RNA, gli alti livelli di carrier RNA in altri kit ccfDNA possono far aumentare i valori delle unità di fluorescenza relativa (RFU), facendo apparire le concentrazioni di ccfDNA più elevate rispetto a quelle reali.

Un secondo fattore è rappresentato dal fatto che gli standard utilizzati con i coloranti fluorescenti sono in genere DNA genomico o di Lambda, di alto peso molecolare. Il ccfDNA è altamente frammentato e ha un peso molecolare relativamente basso. Pertanto, non lega i coloranti fluorescenti con la stessa efficacia del DNA di alto peso molecolare, determinando concentrazioni apparenti inferiori. Se possibile, utilizzare standard di DNA a basso peso molecolare per ottenere una quantificazione più accurata.

Quantificazione basata sull'amplificazione

La qPCR o la PCR digitale forniscono la quantificazione più accurata del ccfDNA. Oltre alla sensibilità, la quantificazione basata sull'amplificazione può indicare l'idoneità dei campioni per le applicazioni a valle basate sull'amplificazione.

12. 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
Non è possibile prelevare gli stantuffi con lo strumento	Assicurarsi di utilizzare un kit di prodotti chimici specifici per Maxwell® CSC; gli stantuffi dei kit Maxwell® CSC sono specifici per i Maxwell® Instruments (vedere Tabella 1).
Bassa resa di ccfDNA	Il Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit può accettare un campione di plasma di massimo 4 ml. Ripetere l'estrazione utilizzando fino a 4 ml di plasma. L'utilizzo di meno di 1 ml di plasma può influire negativamente sul recupero di ccfDNA. Verificare che il volume corretto di soluzione di proteinasi K (PK2) sia stato aggiunto alla camera n.4 della cartuccia. Ripetere l'estrazione dopo aver dispensato 10 µl di soluzione di proteinasi K (PK2) nella camera n.4. La resa può essere ridotta in caso di eluizione in meno di 50 µl di Elution Buffer (RCFD). Ripetere l'estrazione utilizzando 50 µl di Elution Buffer (RCFD). L'Elution Buffer (RCFD) fornito è essenziale per un recupero efficiente del ccfDNA. Non sostituire l'Elution Buffer (RCFD) con tamponi di eluizione alternativi. Ripetere l'estrazione utilizzando Elution Buffer (RCFD). Confermare che il plasma è stato trasferito nelle camere corrette della Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge (vedere Tabella 2 e Figura 1 nella Sezione 6). • Per volumi di ingresso del plasma di 1,0–1,5 ml, trasferire tutto il plasma alla camera n.1. • Per volumi di ingresso del plasma di 1,5–3,0 ml, dividere il plasma in parti uguali nelle camere n.1 e n.3. • Per volumi di ingresso del plasma di 3,0–4,0 ml, aggiungere volumi uguali di plasma alle camere n.1, n.2 e n.3.
Contaminazione DNA genomico	Il preparato di plasma contiene globuli bianchi lisati. Per raccomandazioni sulla preparazione dei campioni di plasma da sangue intero, vedere le Sezioni 5 e 11.A.

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.

13. Prodotti correlati

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
RSC/CSC Plungers	50/confezione	AS1331
Elution Tubes (0,5 ml)	50/confezione	AS6201
Elution Magnet, 16 posizioni	1 cadauno	AS4017
Elution Magnet, 24 posizioni	1 cadauno	AS4018

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

Kit Maxwell® CSC Reagent

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

© 2025 Promega Corporation. Tutti i diritti riservati.

Maxwell è un marchio registrato di Promega Corporation.

Cell-Free DNA BCT è un marchio registrato di Streck LLC.

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 al Promega Technical Services oppure consultare il catalogo Promega online.