

INSTRUKCJA TECHNICZNA

Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit

Instrukcja użytkowania produktu
AS1350

Przestroga: Z kartridżami należy obchodzić się ostrożnie; krawędzie zamknięcia kartridża mogą być ostre.



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanower, Niemcy



INSTRUKCJA UŻYTKOWANIA
PRODUKTU
AS1350



Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit

Dokumentacja techniczna jest dostępna na stronie internetowej pod adresem: www.promega.com/protocols/
 Na tej stronie internetowej można sprawdzić, czy używana wersja niniejszej instrukcji technicznej jest aktualna.
 W razie pytań dotyczących obsługi tego systemu prosimy o kontakt z działem Promega Technical Services
 pod adresem: techserv@promega.com.

1. Opis	2
2. Elementy wyrobu, warunki przechowywania, objaśnienie symboli	3
3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu	5
4. Ograniczenia stosowania produktu	5
5. Przed rozpoczęciem	6
5.A. Przygotowanie próbek FFPE	6
5.B. Przygotowanie kartridża Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge	7
6. Przebieg pracy aparatu	9
7. Czynności po zakończeniu oczyszczania	11
8. Ocena wydajności analitycznej	12
8.A. Zdolność do amplifikacji	12
8.B. Odtwarzalność	15
8.C. Inhibicja (substancje zakłócające)	17
8.D. Zanieczyszczenie krzyżowe	17
9. Ocena wydajności klinicznej	17
9.A. Amplifikacja DNA	18
9.B. Odtwarzalność	19
9.C. Zanieczyszczenie krzyżowe	19
10. Rozwiązywanie problemów	20
11. Źródło	21
12. Powiązane produkty	21
13. Podsumowanie zmian	22

Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit jest dostępny wyłącznie w niektórych krajach.

1. Opis

Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit^(a) jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z aparatami Maxwell® Instrument, które przedstawiono w Tabeli 1 w celu zapewnienia łatwej metody wydajnego i zautomatyzowanego oczyszczania genomowego DNA (gDNA) z próbek tkanek FFPE (tkanek utrwalonych w parafinie). Aparaty Maxwell® CSC Instrument są dostarczane ze wstępnie zaprogramowanymi metodami oczyszczania i przeznaczone do stosowania ze wstępnie napełnionymi kartridżami z odczynnikami oraz z dodatkowymi odczynnikami dostarczonymi w zestawie, co zwiększa wygodę i upraszcza stosowanie. Aparaty Maxwell® CSC Instrument mogą przetworzyć od jednej do maksymalnej dozwolonej liczby próbek w około 45 minut, a oczyszczone DNA nadaje się do bezpośredniego wykorzystania w dalszych oznaczeniach opartych na amplifikacji, takich jak reakcja PCR.

Tabela 1. Kompatybilny z aparatami.

Aparat	Cat. #	Instrukcja techniczna
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

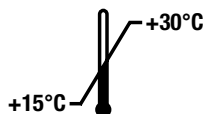
Podstawy metody: Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit umożliwia oczyszczanie kwasu nukleinowego przy wykorzystaniu cząsteczek paramagnetycznych, które zapewniają ruchomą fazę stałą stwarzającą optymalne warunki do wychwytywania próbki, przemycania i oczyszczania gDNA. Aparaty Maxwell® CSC Instrument są aparatami przeprowadzającymi analizy w oparciu o cząsteczki magnetyczne. System ten umożliwia skuteczne wiązanie gDNA z cząsteczkami paramagnetycznymi w pierwszym dołku wstępnie napełnionego kartridża i przenosi próbkę przez dołki kartridża. Zastosowanie magnetycznego wychwytywania pozwala na uniknięcie często występujących problemów, takich jak zatkane końcówki lub częściowe przeniesienie odczynnika, co obniża jakość procesów oczyszczania w innych powszechnie stosowanych zautomatyzowanych systemach.

Uwagi dotyczące próbek: Oczyszczanie DNA z próbek tkanek FFPE może być trudne ze względu na cechy tkanki, takie jak włóknistość, skład lipidowy, poziomy nukleaz i liczba komórek dostępnych w wycinku tkanki. Ponadto zmienność w sposobie obchodzenia się z tkanką przed i podczas utrwalania, w tym czas, przez jaki tkanka jest wystawiona na działanie formaliny podczas procesu utrwalania tkanki, ma duży wpływ na stopień usieciowania i fragmentacji kwasów nukleinowych w tkance FFPE. Wszystkie te atrybuty mogą wpływać na jakość i ilość amplifikowanych kwasów nukleinowych, które można oczyścić z wycinków tkanki FFPE. Podczas opracowywania zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit był oceniany z różnymi typami i formatami ludzkich tkanek FFPE (np. wycinki tkanki FFPE na szkiełkach oraz spirale), aby zapewnić optymalne oczyszczenie dostępnego, nadającego się do amplifikacji DNA.

2. Elementy wyrobu, warunki przechowywania, objaśnienie symboli

PRODUKT	ILOŚĆ	CAT.#
Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit	48 preparatów	AS1350

Do stosowania w diagnostyce in vitro. Wyłącznie do użytku przez specjalistów. Zawiera ilość wystarczającą do przeprowadzenia 48 zautomatyzowanych izolacji z próbek FFPE. Kartridże Maxwell® FFPE Cartridges są przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku.



Zawartość zestawu:

- 25 ml oleju mineralnego
- 20 ml buforu lizującego
- 2 × 1 ml proteiny K (PK)
- 100 µl niebieskiego barwnika
- 1 ml RNazy A
- 48 kartridży Maxwell® FFPE Cartridges
- 50 tłoczków CSC/RSC
- 50 probówek do elucji (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

Warunki przechowywania: Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit należy przechowywać w temperaturze od +15°C do +30°C.



Informacje dotyczące bezpieczeństwa: Kartridże zawierają etanol i izopropanol. Substancje te należy traktować jako łatwopalne, szkodliwe i drażniące.



Elementy zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit zaprojektowano do użytkowania z czynnikami potencjalnie zakaźnymi. Podczas pracy z czynnikami potencjalnie zakaźnymi należy nosić odpowiednie środki ochrony indywidualnej (np. rękawiczki i okulary ochronne). Należy przestrzegać obowiązujących w instytucji wytycznych dotyczących przenoszenia i utylizacji wszystkich czynników potencjalnie zakaźnych używanych z tym systemem.

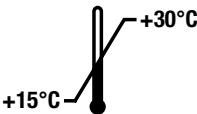


Przestroga: Z kartridżami należy obchodzić się ostrożnie; krawędzie zamknięcia kartridża mogą być ostre.

Informacje dodatkowe: Elementy Maxwell® CSC DNA FFPE Kit zostały dopuszczone do łącznego stosowania na podstawie odpowiednich procedur kwalifikacyjnych i testów kontroli jakości. Nie zaleca się mieszania elementów zestawu z elementami zestawów różnych serii. Należy używać wyłącznie elementów dostarczonych w zestawie. Nie używać kartridży, jeśli zamknięcie na kartridżu było naruszone w momencie dostawy.

2. Elementy wyrobu, warunki przechowywania, objaśnienie symboli (ciąg dalszy)

Objaśnienie symboli

Symbol	Objaśnienie	Symbol	Objaśnienie
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Autoryzowany przedstawiciel
	Przechowywać w temperaturze od +15°C do +30°C.		Wytwórca
	Przeostroga		Środek drażniący
	Zagrożenie dla zdrowia		Zawiera ilość wystarczającą do przeprowadzenia „n” badań
	Conformité Européenne		Ostrzeżenie. Zagrożenie biologiczne.
	Ostrzeżenie. Niebezpieczeństwo zmiadżdżenia.		Numer katalogowy
	Numer serii		Nie używać ponownie

3. Przeznaczenie/zastosowanie produktu

Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z aparatami Maxwell® CSC Instrument oraz metodą oczyszczania Maxwell® CSC DNA FFPE jako wyrób medyczny do diagnostyki in vitro (IVD), służący do zautomatyzowanej izolacji DNA z próbek FFPE (utrwalonych w parafinie) ludzkich tkanek. Oczyszczony DNA nadaje się do stosowania w oznaczeniach wykonywanych na potrzeby diagnostyki in vitro opartych na amplifikacji.

Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit jest przeznaczony do stosowania w temperaturze od 15°C do 30°C. Stosowanie zestawu poza tym zakresem temperatur może prowadzić do uzyskania nieprawidłowych wyników.

Próbki FFPE przygotowane z zastosowaniem 10-procentowej obojętnie buforowanej formaliny mogą być stosowane razem z zestawem Maxwell® CSC DNA FFPE Kit.

Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit jest przeznaczony wyłącznie do użytku przez specjalistów. Wyniki diagnostyczne uzyskane przy wykorzystaniu DNA oczyszczonego za pomocą tego systemu należy interpretować w połączeniu z innymi danymi klinicznymi lub laboratoryjnymi.

4. Ograniczenia stosowania produktu

Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit jest przeznaczony do użytku wyłącznie z próbkami tkanek FFPE. Nie jest przeznaczony do użytku z próbkami tkanek innymi niż FFPE, takimi jak świeże lub zamrożone próbki tkanek. Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit nie jest przeznaczony do stosowania z próbkami innego rodzaju, w tym z próbkami innymi niż ludzkie, ani do oczyszczania RNA.

Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit nie jest przeznaczony do użytku z próbkami tkanek przygotowanymi przy użyciu utrwalaczy innych niż 10-procentowa obojętnie buforowana formalina.

Charakterystykę roboczą zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit oceniono poprzez wyizolowanie DNA z próbek FFPE tkanek o wielkości 0,02–2,0 mm³.

Użytkownik odpowiada za ustalenie charakterystyki roboczej wymaganej w dalszych zastosowaniach diagnostycznych. W przypadku dalszych zastosowań diagnostycznych należy stosować odpowiednie środki kontrolne w zakresie używania DNA oczyszczonego za pomocą zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit.

5. Przed rozpoczęciem

Materiały zapewniane przez użytkownika

- mikrowirówka
- pipetory i końcówki pipet do przenoszenia wstępnie przetworzonych próbek do wstępnie napełnionych kartridży z odczynnikami
- próbki o pojemności 1,5–2,0 ml do inkubacji próbek (np. mikroprobówki o pojemności 1,5 ml, [Cat.# V1231])
- bloki grzewcze ustawione na temperaturę 56°C oraz 80°C (**Uwaga:** Bloki grzewcze ustawione na 56°C i 70°C są potrzebne do przeprowadzenia opcjonalnej nocnej inkubacji).
- próbki FFPE o całkowitej objętości tkanki wynoszącej do 2,0 mm³ (**Uwaga:** Probki należy przechowywać w temperaturze pokojowej [15–30°C]).
- żyłetki (**Uwaga:** Podczas korzystania z żyłetek do celu usunięcia próbki ze szkiełka podstawowego należy zachować ostrożność).



5.A. Przygotowanie próbek FFPE

Wstępne przetwarzanie wycinków próbek

1. Umieścić wycinek w probówce mikrowirówkowej o pojemności 1,5 ml. Umieszczony na szkiełku podstawowym wycinek tkanki należy usunąć przy użyciu czystej żyłetki.
2. Do próbek z próbką należy dodać 300 µl oleju mineralnego. Mieszać przez 10 sekund na mieszadle typu vortex.
3. Probki podgrzewać przez 2 minuty do temperatury 80°C. Podczas przygotowywania mieszaniny wzorcowej podgrzane próbki należy pozostawić w temperaturze pokojowej.
4. Zgodnie z poniższą tabelą należy przygotować mieszaninę wzorcową przy użyciu bufora lizującego, proteinazy K oraz niebieskiego barwnika.

Odczynnik	Ilość/Reakcja	Reakcje (liczba przebiegów + 1)	Łącznie
Bufor lizujący	224 µl	n + 1	224 × (n + 1) µl
Proteinaza K	25 µl	n + 1	25 × (n + 1) µl
Niebieski barwnik	1 µl	n + 1	1 × (n + 1) µl

5. Do każdej z próbek z próbką dodać 250 µl mieszaniny wzorcowej i mieszać przez 5 sekund na mieszadle typu vortex.
6. Wirować przez 20 sekund z prędkością 10 000 × g w celu oddzielenia warstw. Jeśli w warstwie wodnej (niższa, niebieska warstwa) obecne są grudki, należy delikatnie wymieszać fazę wodną przy użyciu pipety.
7. Probówki z próbką należy przenieść do bloku grzejnego podgrzanego do temperatury 56°C i inkubować przez 30 minut.

8. Wybrać jedną z następujących kombinacji czasu i temperatury inkubacji:
 - a. **Metoda standardowa:** Probówki z próbką należy przenieść do bloku grzejnego podgrzanego do temperatury 80°C i inkubować przez 4 godziny.
 - b. **Metoda opcjonalna:** Inkubować próbkę przez noc w temperaturze 70°C przez 14–18 godzin.

Uwaga: W przypadku mniejszych objętości wejściowych próbki (poniżej 0,1 mm³) opcjonalna inkubacja przez noc w temperaturze 70°C może nie być optymalna. Jeśli inkubacja przez noc nie oczyści wystarczającego stężenia DNA w przypadku próbek o mniejszej objętości wejściowej, należy użyć standardowej metody inkubacji przez 4 godziny w temperaturze 80°C.
9. Probówki z próbką należy przenieść na stół laboratoryjny i schładzać je przez 5 minut do temperatury pokojowej.
10. Dodać 10 µl RNazy A do niebieskiej fazy wodnej w każdej probówce z próbką. Wymieszać przez pipetowanie.
11. Inkubować przez 5 minut w temperaturze pokojowej (15–30°C). Podczas inkubacji przygotować kartridże w sposób opisany w rozdziale 5.B.
12. Wirować w mikrowirówce z pełną prędkością przez 5 minut.
13. Natychmiast przenieść niebieską fazę wodną zawierającą DNA do dolka nr 1 w kartridżu Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge.

5.B. Przygotowanie kartridża Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge

1. Przed rozpoczęciem pracy z kartridżami Maxwell® FFPE Cartridges, tłoczkami CSC/RSC i probówkami do elucji należy zmienić rękawiczki. Kartridże są ustawiane na tacach blatowych na zewnątrz aparatu, po czym tace blatowe, zawierające kartridże i próbki, są następnie przenoszone do aparatu w celu rozpoczęcia oczyszczania. Umieścić każdy kartridż na tacy blatowej tak, aby dołek nr 1 (największy dołek w kartridżu) znajdował się jak najdalej od probówek do elucji (Rysunek 2). Nacisnąć kartridż, aby zatrzasknął się w odpowiednim położeniu. Upewnić się, że oba końce kartridża znajdują się w całości na stojaku na kartridże. Ostrożnie zdjąć zamknięcie tak, aby usunąć całe zamknięcie z górnej części kartridża. Upewnić się, że cała taśma uszczelniająca i pozostałości kleju zostały usunięte z kartridża.



Przestroga: Z kartridżami należy się obchodzić ostrożnie. Krawędzie zamknięcia kartridża mogą być ostre.

2. Umieścić jeden tłoczek w dolku nr 8 każdego kartridża.
3. Umieścić pustą probówkę do elucji w położeniu probówki do elucji dla każdego kartridża na tacach blatowych.

Uwaga: Należy używać wyłącznie probówek do elucji dostarczonych w zestawie Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Inne probówki do elucji mogą nie być zgodne z aparatami Maxwell® CSC Instrument, co może wpłynąć na wynik oczyszczania DNA.

4. Na dnie każdej probówki do elucji umieścić 50 µl Nuclease-Free Water.

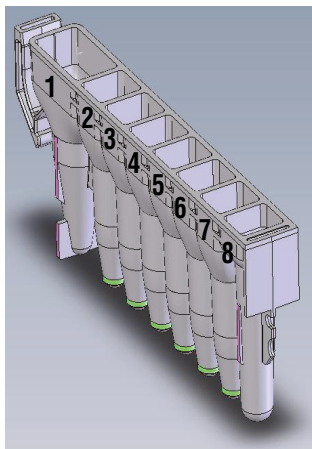
Uwaga: Należy używać wyłącznie Nuclease-Free Water dostarczonej w zestawie Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Użycie innych buforów do elucji może wpłynąć na oczyszczanie DNA.

5.B. Przygotowanie kartridża Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge (ciąg dalszy)

Uwagi dotyczące przygotowania kartridży Maxwell® CSC DNA FFPE Cartridge



Wycieki próbki lub odczynnika na dowolną część tacy blatowej należy usuwać za pomocą roztworu detergentu i wody. Następnie należy spryskać powierzchnię sprayem bakteriobójczym lub wytrzeć ściereczką i przemyć ją wodą. Nie należy stosować wybielacza do czyszczenia części aparatu.



11339TA

Zawartość dołka dodawana przez użytkownika:

1. Wstępnie przetworzona próbka
8. Tłoczek CSC/RSC

Rysunek 1. Kartridż Maxwell® CSC Cartridge. Wstępnie przetworzona próbka FFPE jest dodawana do dołka nr 1, a tłoczek jest wprowadzany do dołka nr 8.



Rysunek 2. Ustawianie i konfiguracja tacy blatowej. Nuclease-Free Water jest dodawana do próbek do elucji w sposób przedstawiony na rysunku.

6. Przebieg pracy aparatu

Metodę Maxwell® CSC DNA FFPE do aparatu Maxwell® CSC Instrument można pobrać ze strony internetowej firmy Promega: www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-cscsoftware-firmware-methods/. Metodę Maxwell® CSC DNA FFPE do aparatu Maxwell® CSC 48 Instrument można pobrać ze strony internetowej firmy Promega:

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

1. Włączyć aparat Maxwell® Instrument i tablet. Zalogować się na tablecie i uruchomić oprogramowanie Maxwell® IVD Mode, dwukrotnie dotykając ikony na pulpicie. Aparat przeprowadzi autotest i ustawi w położeniu wyjściowym wszystkie ruchome części.
2. Wybrać opcję **Start** na ekranie głównym.
3. Zeskanować lub wprowadzić kod kreskowy znajdujący się w prawym górnym rogu etykiety zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit i nacisnąć przycisk **OK**, aby automatycznie wybrać metodę, która zostanie zastosowana (Rysunek 3).

Uwaga: Kod kreskowy metody zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit jest wymagany do przeprowadzenia oczyszczania DNA przy użyciu aparatów Maxwell® CSC Instrument. Etykieta zestawu zawiera dwa kody kreskowe. Kod kreskowy metody pokazano na Rysunku 3. Jeżeli nie można zeskanować kodu kreskowego, należy skontaktować się z działem Promega Technical Services.



Rysunek 3. Etykieta zestawu z kodem kreskowym do zeskanowania. Zeskanować kod kreskowy znajdujący się w czerwonym polu w prawym górnym rogu etykiety zestawu, aby rozpocząć cykl oczyszczania.

4. Na ekranie „Konfiguracja kartridży” dotknąć pozycji kartridża, aby zaznaczyć/odznaczyć wszelkie położenia, które mają zostać użyte w ramach przebiegu ekstrakcji. Wprowadzić wymagane dane identyfikacyjne próbek i nacisnąć przycisk **Rozpocznij**, aby kontynuować.

Uwaga: Podczas użytkowania aparatu Maxwell® CSC 48 Instrument nacisnąć przycisk **Przód** lub **Tył**, aby wybrać lub cofnąć wybór pozycji kartridża na każdym stojaku na kartridże.

5. Po otwarciu drzwi potwierdzić, czy wykonano wszystkie czynności z listy kontrolnej ekstrakcji. Sprawdzić, czy wstępnie przetworzone próbki zostały dodane do dołka nr 1 kartridży, czy kartridże zostały załadowane do aparatu, czy otwarte próbki do elucji zawierające bufor do elucji są obecne oraz czy tłoczki zostały umieszczone w dołku nr 8. Przenieść tacę białową zawierającą przygotowane kartridże do platformy aparatu Maxwell®.

6. Przebieg pracy aparatu (ciąg dalszy)

Wkładanie tacy blatowej Maxwell®: Stojak na kartridże należy trzymać za brzegi, aby uniknąć wypadnięcia kartridży. Upewnić się, że taca blatowa została umieszczona w aparacie Maxwell® w taki sposób, że próbówki do elucji znajdują się możliwie jak najbliżej drzwi. Przetawić tył stojaka na kartridże w dół i ustawić ją na aparacie tak, aby jej tył był oparty o tylną część platformy aparatu. Docisnąć przednią część stojaka na kartridże, aby osadzić go na platformie aparatu. W przypadku trudności z ustawieniem stojaka na kartridże na platformie sprawdzić, czy stojak na kartridże jest ułożony w prawidłowej orientacji. Upewnić się, że stojak na kartridże jest odpowiednio wyrównany i osadzony na platformie aparatu.

Uwaga: Sprawdzić identyfikator na stojakach na kartridże Maxwell® z 24 pozycjami, aby określić, czy powinny zostać umieszczone z przodu, czy z tyłu aparatu.

6. Potwierdzić, że wszystkie czynności wskazane przed rozpoczęciem przetwarzania zostały wykonane, i dotknąć przycisku **Start**, aby zamknąć drzwi aparatu i rozpocząć przetwarzanie.

Uwaga: W przypadku korzystania z aparatu Maxwell® Instrument z 48 pozycjami i włączenia systemu wizualizacji skanowanie tac blatowych rozpocznie się po zamknięciu drzwi. Wszelkie błędy w konfiguracji stojaków na kartridże (np. tłoczki nieznajdujące się w dołku nr 8, brak otwartych probówek do elucji) spowoduje, że oprogramowanie powróci do ekranu „Konfiguracja kartridży”, a problematyczne pozycje zostaną oznaczone wykrzyknikiem w czerwonym okręgu. Dotknąć wykrzyknika, aby uzyskać opis błędu i rozwiązać problemy związane z błędami. Ponownie dotknąć przycisku **Start**, aby powtórzyć skanowanie stojaków na kartridże i rozpocząć przebieg ekstrakcji.



Ostrzeżenie: Niebezpieczeństwo zmiążdżenia.

7. Aparat Maxwell® Instrument natychmiast rozpocznie cykl oczyszczania. Na ekranie będą wyświetlane wykonywane kroki oraz przybliżony czas do zakończenia cyklu.

Uwagi:

- a. Dotknięcie przycisku **Przerwij** spowoduje przerwanie przebiegu. Wszystkie próbki z przerwane przebiegu zostaną utracone.
 - b. Jeśli przebieg zostanie przerwany przed ukończeniem, może wyświetlić się monit z prośbą o sprawdzenie, czy tłoczki są nadal załadowane na słupku tłoczków. Jeśli tłoczki znajdują się na słupku tłoczków, należy przeprowadzić procedurę **Czyszczenie** po wyświetleniu monitu. Jeśli tłoczki nie znajdują się na słupku tłoczków, można pominąć procedurę **Czyszczenie** po wyświetleniu monitu. Próbkki zostaną utracone.
8. Po zakończeniu przebiegu w interfejsie użytkownika zostanie wyświetlony komunikat informujący o zakończeniu metody.

Koniec przebiegu

9. Po zakończeniu metody postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie, aby otworzyć drzwi. Sprawdzić, czy tłoczki znajdują się w dolku nr 8 kartridża po zakończeniu cyklu. Jeśli tłoczki nie zostaną usunięte ze słupka tłoczków, należy postępować zgodnie z wytycznymi przedstawionymi w instrukcji obsługi określonego aparatu Maxwell® Instrument (patrz Tabela 1), aby przeprowadzić procedurę **Czyszczenie** i podjąć próbę rozładunku tłoczków.

10. Probówki do elucji zawierające DNA należy zamknąć zatyczką i wyjąć natychmiast po zakończeniu cyklu, aby zapobiec odparowaniu eluatów. Wyjąć tace blatowe Maxwell® z aparatu.

Uwaga: Podczas zdejmowania tacy blatowej z platformy aparatu trzymać ją za krawędzie. Przed uruchomieniem protokołu odfekowania przy użyciu promieniowania ultrafioletowego upewnić się, że próbki zostały usunięte z aparatu w celu zapobieżenia uszkodzeniu oczyszczonego kwasu nukleinowego. Próbki DNA można przechowywać maksymalnie przez jeden tydzień w temperaturze 4°C oraz maksymalnie przez jeden miesiąc w temperaturze -20°C.



11. Kartridże i tłoczki należy usunąć z tac blatowych i wyrzucić jako odpady niebezpieczne zgodnie z procedurami instytucjonalnymi. Kartridże, tłoczki i probówki do elucji są przeznaczone do jednorazowego użytku. Nie wolno ponownie używać kartridży Maxwell® FFPE Cartridges, tłoczków CSC/RSC ani probówek do elucji.

7. Czynności po zakończeniu oczyszczania

Ustalić, czy uzysk próbki oczyszczonego DNA spełnia wymogi wejściowe dla odpowiedniego oznaczenia diagnostycznego w kierunku replikacji przed ich wykorzystaniem w tym oznaczeniu. Działanie zestawu oceniono na podstawie oczyszczania amplifikowanego DNA. Inne metody ilościowego oznaczania, w tym absorbancja i wiązanie barwnika fluorescencyjnego, mogą nie korelować z amplifikacją (1). Odczyty absorbancji dla oczyszczonych próbek FFPE mogą zawyżać wydajność; zaleca się stosowanie innych metod określających wydajność (1).

8. Ocena wydajności analitycznej

Wydajność analityczna zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit została oceniona przy użyciu próbek ludzkiej tkanki FFPE w aparacie Maxwell® CSC Instrument. Wydajność zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit porównywalna z aparatem Maxwell® CSC 48 Instrument została zademonstrowana jako część rozwoju tego aparatu.

8.A. Zdolność do amplifikacji

Tabela 2. Amplifikacja DNA oczyszczonego z wycinków tkanki FFPE. DNA oczyszczono z pojedynczych wycinków tkanki FFPE o typowej wielkości za pomocą zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit przy użyciu standardowych i nocnych metod obróbki wstępnej. Ilość wyekstrahowanego DNA oszacowano metodą PCR w czasie rzeczywistym, kierując się RNazą P (102 pz) jako celem kwantyfikacji. Amplifikację genu odwrotnej transkryptazy telomerazy (TERT; 164 pz) mierzono jako cel genu większej wielkości i pojedynczej kopii w celu oceny jakości DNA. Niektóre próbki, które nie uległy amplifikacji, miały niską jakość próbek wejściowych, ponieważ podobny nieudany wynik zaobserwowano przy użyciu konkurencyjnego zestawu do oczyszczania DNA z próbek. Dane z próbek uznanych za słabej jakości zostały wyłączone z analizy. Przedstawiono średnie stężenie DNA dla każdego zestawu powtórzeń. Wszystkie wycinki tkanki FFPE dawały co najmniej 100 kopii/μl RNazy P i były wykrywalne dla TERT po wstępnej obróbce metodami standardowymi i nocnymi.

Tabela 2. Amplifikacja DNA oczyszczonego z wycinków tkanki FFPE (ciąg dalszy).

Tkanki	Warunki przetwarzania wstępnego	Próbka 1		Próbka 2		Próbka 3	
		Stężenie (kopie/μl) lub wykrywanie		Stężenie (kopie/μl) lub wykrywanie		Stężenie (kopie/μl) lub wykrywanie	
		RNaza P	TERT	RNaza P	TERT	RNaza P	TERT
Pierś*	Standard	439	Wykryto				
	Noc	273	Wykryto				
Okrężnica*	Standard	1313	Wykryto	2277	Wykryto		
	Noc	983	Wykryto	1050	Wykryto		
Przelyk*	Standard	366	Wykryto	1314	Wykryto		
	Noc	243	Wykryto	755	Wykryto		
Wątroba*	Standard	2472	Wykryto	475	Wykryto		
	Noc	2206	Wykryto	434	Wykryto		
Płuco	Standard	2939	Wykryto	3006	Wykryto	5217	Wykryto
	Noc	1176	Wykryto	1510	Wykryto	3230	Wykryto
Trzustka	Standard	570	Wykryto	738	Wykryto	110	Wykryto
	Noc	454	Wykryto	565	Wykryto	114	Wykryto
Gruczoł krokowy	Standard	936	Wykryto	1003	Wykryto	3064	Wykryto
	Noc	829	Wykryto	634	Wykryto	1931	Wykryto
Żołądek	Standard	659	Wykryto	548	Wykryto	404	Wykryto
	Noc	454	Wykryto	245	Wykryto	223	Wykryto
Pęcherz moczowy	Standard	482	Wykryto	421	Wykryto	296	Wykryto
	Noc	355	Wykryto	331	Wykryto	262	Wykryto
Jelito cienkie	Standard	741	Wykryto	424	Wykryto	1903	Wykryto
	Noc	441	Wykryto	389	Wykryto	1070	Wykryto
Macica	Standard	2124	Wykryto	3921	Wykryto	4081	Wykryto
	Noc	1556	Wykryto	3117	Wykryto	2532	Wykryto

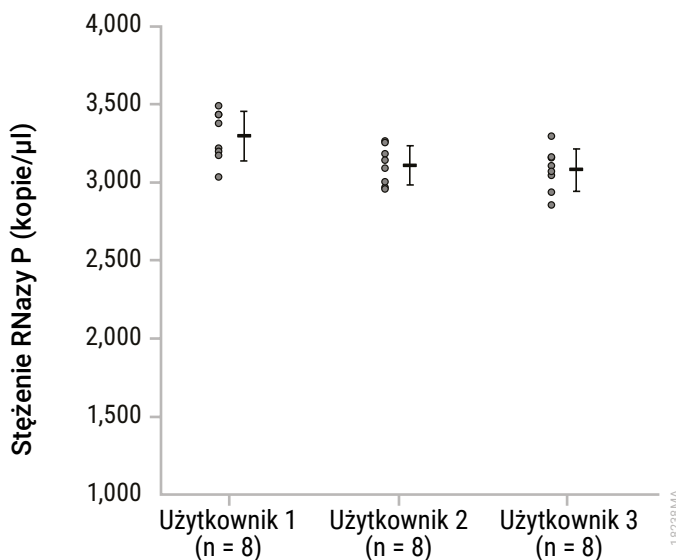
* Zbadano tkankę piersi z jednej próbki. Zbadano tkanki okrężnicy, przelyku i wątroby z dwóch różnych próbek. W przypadku wszystkich innych typów tkanek przetestowano trzy różne próbki. Ciemno zacienione komórki tabeli wskazują próbki nietestowane.

8.A. Zdolność do amplifikacji (ciąg dalszy)

Tabela 3. Odtwarzalność amplifikacji DNA. Trzech oddzielnych użytkowników oczyściło DNA z wycinków tkanki FFPE o zmniejszonej wielkości przy użyciu zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. DNA oczyszczono z 0,02 mm³ i 0,1 mm³ wycinków tkanki okrężnicy i wątroby zgodnie ze standardową metodą przetwarzania wstępnego. Stężenie DNA określono metodą qPCR w dwóch powtórzeniach, stosując cel RNazy P (102 pz), a średnie stężenie DNA dla każdego wycinka tkanki i każdego typu tkanki obliczono dla każdego użytkownika. Najniższe średnie stężenie DNA wśród wszystkich użytkowników i wszystkich tkanek dla 0,02 mm³ i 0,1 mm³ tkanki wynosiło odpowiednio 45 kopii/μl i 260 kopii/μl.

Tkanki	Identyfikator użytkownika	Rozmiar próbki tkanki	Stężenie (kopie/μl)
Okrężnica	1	0,10 mm ³	332
		0,02 mm ³	108
	2	0,10 mm ³	445
		0,02 mm ³	188
	3	0,10 mm ³	383
		0,02 mm ³	45
Wątroba	1	0,10 mm ³	401
		0,02 mm ³	54
	2	0,10 mm ³	307
		0,02 mm ³	73
	3	0,10 mm ³	260
		0,02 mm ³	68

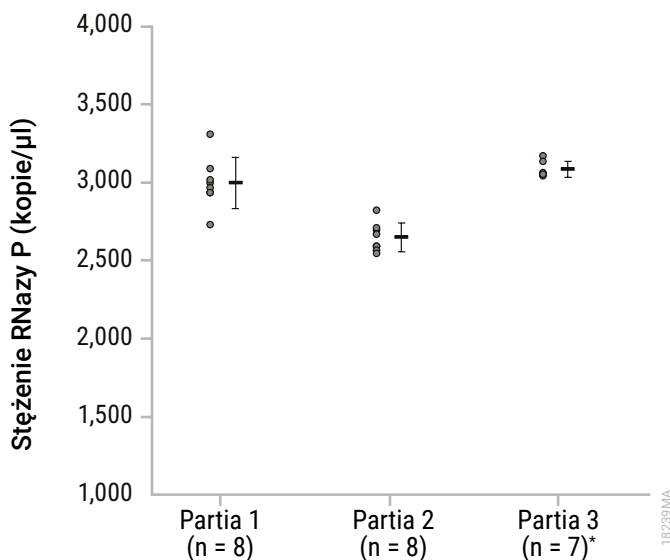
8.B. Odtwarzalność



Rysunek 4. Powtarzalność oczyszczania DNA między użytkownikami została scharakteryzowana przez trzech użytkowników oczyszczających DNA z seryjnych wycinków próbki tkanki piersi FFPE.

Eluaty amplifikowano metodą qPCR przy użyciu docelowej RNazy P (102 pz) i obliczono średnie stężenia DNA oraz wartości CV między przebiegami i w ramach przebiegu. Wartości CV w ramach przebiegu wynosiły 4,9% (użytkownik 1), 4,0% (użytkownik 2) i 4,5% (użytkownik 3), a wartość CV między przebiegami u wszystkich trzech użytkowników wynosiła 5,3%, co wskazuje na powtarzalność oczyszczania DNA przez każdego użytkownika i wielu użytkowników. W przypadku każdego zestawu danych kropki po lewej stronie oznaczają wartości danej próbki, a średnia z odchyleniem standardowym jest widoczna po prawej stronie.

8.B. Odtwarzalność (ciąg dalszy)



Rysunek 5. Powtarzalność oczyszczania DNA między partiami scharakteryzowano przez oczyszczanie DNA przez jednego użytkownika z seryjnych wycinków próbki tkanki piersi FFPE przy użyciu trzech serii zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Eluaty amplifikowano metodą qPCR przy użyciu docelowej RNazy P (102 pz) i obliczono średnie stężenia DNA, wykazując powtarzalność oczyszczania DNA przy użyciu każdej partii. W przypadku każdego zestawu danych kropki po lewej stronie oznaczają wartości danej próbki, a średnia z odchyleniem standardowym jest widoczna po prawej stronie. * Próba wartości oddalonych Dixona pozwoliła na wykluczenie jednego powtórzenia w tym zestawie jako odstającego przy progu ufności 95%. To powtórzenie zostało wykluczone z analizy.

8.C. Inhibicja (substancje zakłócające)

Tabela 4. Analiza oczyszczonego DNA pod kątem substancji zakłócających. DNA oczyszczono z jednego lub dwóch osadzonych na szkiełku wycinków tkanki okrężnicy i wątroby o typowej wielkości, stosując standardowe i nocne metody przetwarzania wstępnego za pomocą zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Dla każdego oczyszczonego DNA złożono dwa zestawy amplifikacji przy użyciu 2 μ l i 8 μ l wejściowego DNA i obliczono różnicę w wartościach C_q (ΔC_q) między dwoma wejściowymi DNA. Dla czterokrotnej różnicy w ilości wprowadzonego DNA należałoby się spodziewać ΔC_q równego 2. Wszystkie testowane warunki skutkowały wartościami ΔC_q wynoszącymi 2 cykle $\pm$ 1 cykl, wykazując, że wszelkie potencjalne substancje zakłócające, które kopurowały z DNA, nie przeszkadzały w dalszej amplifikacji.

Typ tkanki FFPE	Warunki przetwarzania wstępnego	Liczba wycinków tkanki FFPE	RNaza P		
			Średnia 2 μ l C_q (cykle)	Średnia 8 μ l C_q (cykle)	Średnia wartość ΔC_q (cykle)
Okrężnica	Standard	1 (n = 3)	26,4	24,5	1,9
		2 (n = 3)	25,7	23,6	2,0
	Noc	1 (n = 2)	28,3	26,0	2,3
		2 (n = 3)	27,5	25,0	2,4
Wątroba	Standard	1 (n = 3)	25,5	23,5	2,0
		2 (n = 3)	24,5	22,6	1,9
	Noc	1 (n = 3)	26,8	24,7	2,1
		2 (n = 3)	25,8	23,7	2,0

8.D. Zanieczyszczenie krzyżowe

DNA wyekstrahowano z ośmiu powtórzonych wycinków próbki tkanki płucnej FFPE i ośmiu kontroli ujemnych (woda) przy użyciu zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Kartridże Maxwell® CSC zawierające wstępnie przetworzone próbki FFPE lub kontrolę ujemną (woda) poddano obróbce w naprzemiennych pozycjach pokładu w aparacie Maxwell® CSC Instrument. Aby określić, czy wystąpiło jakiegokolwiek zanieczyszczenie krzyżowe między próbkami, powstałe eluaty testowano w dwóch powtórzeniach za pomocą qPCR ukierunkowanego na gen RNazy P (102 pz) w celu wykrycia jakiegokolwiek zanieczyszczenia DNA w kontrolach ujemnych z sąsiednich próbek FFPE. W żadnej z kontroli ujemnych nie wykryto żadnego zanieczyszczającego DNA.

9. Ocena wydajności klinicznej

Wydajność kliniczna zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit została oceniona przez zewnętrzne laboratorium kliniczne przy użyciu próbek ludzkich tkanek FFPE i aparatu Maxwell® CSC Instrument.

9.A. Amplifikacja DNA

Tabela 5. Amplifikacja DNA wyekstrahowanego z tkanek FFPE. DNA wyekstrahowany z łącznie 21 próbek tkanki FFPE przy użyciu zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit i aparatu Maxwell® CSC Instrument został zamplifikowany w teście qPCR ukierunkowanym na gen c-KIT typu dzikiego przy użyciu testu laboratoryjnego COLD-PCR C-KIT D816V. DNA wyekstrahowany z tych samych próbek przy użyciu standardowej laboratoryjnej metody oczyszczania kwasów nukleinowych (Laboratoryjna Metoda Referencyjna) amplifikowano w tym samym teście w celach porównawczych. Wykazano różnicę w wartościach C_q (ΔC_q) pomiędzy DNA oczyszczonym z tej samej próbki tkanki FFPE przy użyciu zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit i laboratoryjnej metody referencyjnej. Amplifikacja oczyszczonego DNA z zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit koreluje z laboratoryjną metodą referencyjną.

Próbka tkanki FFPE	Średnia wartość C_q		ΔC_q
	Zestaw Maxwell® CSC DNA FFPE Kit	Laboratoryjna metoda referencyjna	
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. Odtwarzalność

Tabela 6. Odtwarzalność wyników pomiędzy testerami. Aby zademonstrować spójność wyników między testerami w typowym środowisku użytkownika, DNA wyekstrahowany z siedmiu różnych próbek tkanek FFPE przez dwóch oddzielnych testerów przy użyciu zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit został poddany amplifikacji metodą qPCR ukierunkowanej na gen c-KIT typu dzikiego przy użyciu testu COLD-PCR C-KIT D816V laboratorium badawczego. Eluaty z tej samej próbki tkanki FFPE były badane w tym samym teście, aby zminimalizować wpływ zmienności testu qPCR na wyniki. Różnicę w wartościach C_q (ΔC_q) uzyskanych przy użyciu oczyszczonego DNA z tej samej próbki tkanki FFPE przez dwóch różnych testerów przedstawiono w tabeli. Wartości ΔC_q między testerami wahały się w granicach 0,12–0,97, wykazując odtwarzalność amplifikowanego DNA przez wielu testerów.

Próbka tkanki FFPE	Średnia wartość C_q		ΔC_q
	Tester 1	Tester 2	
1	26,57	27,54	0,97
2	26,65	26,53	0,12
3	24,16	24,39	0,23
4	27,05	26,64	0,40
5	24,64	24,29	0,36
6	24,54	24,47	0,07
7	24,25	24,06	0,20

9.C. Zanieczyszczenie krzyżowe

Oceniono zanieczyszczenie krzyżowe występujące pomiędzy próbkami podczas ekstrakcji DNA przy użyciu zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit w typowym środowisku użytkownika. Ekstrakcję DNA przy użyciu zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit przeprowadzono z użyciem ośmiu różnych próbek tkanek FFPE i ośmiu kontroli ujemnych (woda) w tym samym przebiegu aparatu. Kartridże Maxwell® CSC zawierające próbki tkanek FFPE lub kontrole ujemne (woda) były przetwarzane w naprzemiennych, sąsiednich pozycjach tacy w aparacie Maxwell® CSC Instrument. Otrzymane eluaty były badane w dwóch powtórzeniach metodą qPCR ukierunkowaną na dziki gen c-KIT przy użyciu testu COLD-PCR C-KIT D816V laboratorium badawczego w celu wykrycia zanieczyszczającego DNA w kontrolach ujemnych z sąsiednich próbek FFPE. W ośmiu kontrolach ujemnych nie wykryto żadnego zanieczyszczającego DNA.

10. Rozwiązywanie problemów

W przypadku pytań, na które nie można znaleźć odpowiedzi w niniejszym dokumencie, należy skontaktować się z lokalnym oddziałem firmy Promega lub jej dystrybutorem. Informacje kontaktowe są dostępne na stronie internetowej: www.promega.com; adres e-mail: techserv@promega.com

Objawy

Niższe niż oczekiwane stężenie DNA w eluacie (typowy wycinek FFPE powinien pozwolić na uzyskanie amplifikowalnego DNA w oparciu o wielkość tkanki, skład komórkowy, stan utrwalenia formaliną i postępowanie proceduralne)

Przyczyny i komentarze

Charakterystykę roboczą zestawu oceniono poprzez wyizolowanie DNA z próbek tkanek FFPE do 2,0 mm³. Nie zaprojektowano go do próbek o objętości większej niż 2,0 mm³. Używać tylko wycinków zgodnych ze specyfikacją rozmiaru.

Zestaw jest zaprojektowany do użytku z próbkami tkanek FFPE. Nie jest zaprojektowany do użytku z próbkami tkanek innymi niż FFPE, takimi jak świeże lub zamrożone próbki tkanek. Czasy inkubacji i temperatury były badane w celu zapewnienia optymalnej wydajności.

Zestaw nie jest przeznaczony do użytku z próbkami tkanek przygotowanymi przy użyciu utrwalaczy innych niż 10-procentowa obojętnie buforowana formalina. Należy skontaktować się z laboratorium patologii lub dostawcą w celu potwierdzenia, czy nie użyto innego utrwalacza.

Roszczenia wynikające z zastosowania barwionych szkiełek podstawowych lub wycinków nie będą rozpatrywane. Proces oczyszczania należy powtórzyć z użyciem bezbarwnego szkiełka podstawowego lub wycinka.

Działanie zestawu oceniono na podstawie oczyszczania amplifikowanego DNA. Inne metody ilościowego oznaczania, w tym absorbancja i wiązanie barwnika fluorescencyjnego, mogą nie korelować z amplifikacją. Użyć oceny ilościowej, aby ocenić stopień oczyszczenia.

W przypadku mniejszych objętości wejściowych próbki (poniżej 0,1 mm³) opcjonalna inkubacja przez noc w temperaturze 70°C może nie być optymalna. Jeśli inkubacja przez noc nie oczyści wystarczającego stężenia DNA w przypadku próbek o mniejszej objętości wejściowej, należy użyć metody standardowego usuwania sieciowania przez 4 godziny w temperaturze 80°C.

Objawy

Jakość poniżej oczekiwań
(eluat zawiera znacznie pofragmentowane
DNA lub inhibitory dla dalszego oznaczania
analitycznego)

Przyczyny i komentarze

Wycinek tkanki wykorzystywany do oczyszczania może zawierać pofragmentowane DNA z powodu warunków i sposobów utrwalania w formalinie. Jeśli DNA był pofragmentowany przed ekstrakcją/oczyszczaniem, pofragmentowany DNA zostanie oczyszczony przy użyciu tego zestawu. Należy powtórzyć proces przy użyciu sąsiedniego wycinka w celu oceny, czy problem dotyczy wycinka, czy procesu.

Niektóre oznaczenia oparte na amplifikacji są szczególnie wrażliwe na inhibitory. Dalsze kontrole oznaczeń powinny zidentyfikować obecność inhibitorów amplifikacyjnych w eluacie. Użytkownik jest odpowiedzialny za sprawdzenie kompatybilności produktu z oznaczeniami w kierunku replikacji.

Wszelkie poważne incydenty, które miały miejsce w związku z urządzeniem, które doprowadziły lub mogą prowadzić do śmierci lub poważnych obrażeń użytkownika lub pacjenta, należy niezwłocznie zgłaszać producentowi. Użytkownicy mający siedzibę w Unii Europejskiej powinni również zgłaszać wszelkie poważne incydenty właściwemu organowi państwa członkowskiego, w którym użytkownik i/lub pacjent ma siedzibę.

11. Źródło

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

12. Powiązane produkty

Aparatura i akcesoria

Produkt	Ilość	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	1 szt.	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 szt.	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 szt.	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 szt.	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 szt.	AS8402
Microtube, 1,5 ml	1000 szt./zestaw	V1231

* Do stosowania w diagnostyce in vitro. Niniejszy produkt jest dostępny wyłącznie w niektórych krajach.

Zestawy odczynników Maxwell® CSC

Na stronie **www.promega.com** znajduje się lista dostępnych zestawów do oczyszczania Maxwell® CSC.

13. Podsumowanie zmian

W wersji 10/22 niniejszego dokumentu wprowadzono następujące zmiany:

1. Rozdział 3 zostały zmieniony na Przeznaczenie/zastosowanie produktu.
2. Dodano rozdziały 8 i 9.
3. Zaktualizowano dokument pod kątem zgodności z Rozporządzeniem (UE) 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.

^(a)Amerykańska publikacja patentowa nr 7,329,488 oraz południowokoreańska publikacja patentowa nr 100483684.

© 2013–2022 Promega Corporation. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Maxwell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Promega Corporation.

Produkty mogą być przedmiotem zgłoszonych bądź przyznanych patentów lub mogą podlegać pewnym ograniczeniom. Więcej informacji można znaleźć na naszej stronie internetowej.

Wszystkie ceny i dane techniczne mogą ulec zmianie bez wcześniejszego powiadomienia.

Oświadczenia dotyczące produktów mogą ulec zmianie. Aby uzyskać aktualne informacje na temat produktów firmy Promega, należy skontaktować się z działem Promega Technical Services lub zapoznać się z katalogiem produktów firmy Promega dostępnym w Internecie.