

MANUAL TÉCNICO

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit

Instrucciones de uso del producto
AS1580

Precaución: Manipule los cartuchos con cuidado, los bordes del sistema de sellado podrían estar afilados.

Nota: Para utilizar el Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit, el método Maxwell® CSC Rapid ccfDNA debe cargarse en los Maxwell® CSC o Maxwell® CSC 48 Instruments.



INSTRUCCIONES DE
USO DEL PRODUCTO
AS1580



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Alemania



Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit

Toda la literatura técnica se encuentra disponible en: www.promega.com/protocols/

Visite nuestro sitio web para comprobar que está utilizando la versión más reciente de este manual técnico.

Si tiene alguna pregunta sobre el uso de este sistema, póngase en contacto con Promega Technical Services: techserv@promega.com

1. Descripción	2
2. Componentes del producto, condiciones de almacenamiento y leyenda de símbolos.....	3
3. Finalidad del producto/uso previsto	5
4. Limitaciones de uso del producto	5
5. Preparación de muestras de plasma.....	5
6. Preparación de los Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges.....	6
7. Configuración y ejecución del Maxwell® Instrument.....	9
8. Después de la purificación	11
9. Evaluación del rendimiento analítico	11
9.A. Cantidad y calidad del ccfDNA.....	12
9.B. Amplificabilidad e inhibición (sustancias interferentes)	14
9.C. Cuantificación del ccfDNA mediante tinción fluorescente y PCR cuantitativa	15
9.D. Reproducibilidad	15
9.E. Contaminación cruzada.....	16
9.F. Compatibilidad con la secuenciación de próxima generación.....	16
9.G. Compatibilidad con PCR digital	16
10. Evaluación de la eficacia clínica	17
11. Consideraciones al trabajar con ccfDNA	17
11.A. Preparación del plasma.....	17
11.B. Recomendaciones para la cuantificación del ccfDNA	18
12. Solución de problemas	19
13. Productos relacionados	20

El Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit solamente está disponible en algunos países.

1. Descripción

El Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit se utiliza con los instrumentos Maxwell® especificados en la Tabla 1 para proporcionar un método sencillo para la extracción y purificación eficiente y automatizada del ADN libre circulante (ccfDNA) de 1 ml a 4 ml de muestras de plasma humano. Los Maxwell® CSC Instruments están diseñados para su uso con cartuchos de reactivos predispensados y métodos de extracción preprogramados, que maximizan la simplicidad y la comodidad. El método Maxwell® CSC Rapid ccfDNA puede procesar desde una muestra hasta la cantidad máxima de muestras admitidas por los Maxwell® CSC Instruments en menos de 30 minutos. El ccfDNA extraído se puede utilizar directamente en una variedad de aplicaciones posteriores, como PCR digital y secuenciación de próxima generación (NGS).

Tabla 1. Instrumentos compatibles.

Instrumento	Cat.#	Manual técnico	Cantidad máxima de muestras
Maxwell® CSC	AS6000	TM457	16
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623	48

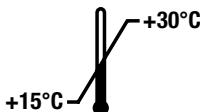
Principio del método

El Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit purifica el ccfDNA de muestras de plasma mediante partículas paramagnéticas, que proporcionan una fase sólida móvil que optimiza la recolección de muestras, el lavado y la purificación de ccfDNA. Los Maxwell® Instruments son instrumentos de manipulación de partículas magnéticas que unen eficazmente el ccfDNA a las partículas paramagnéticas en los primeros tres pocillos de un cartucho precargado. Las muestras se procesan mediante una serie de lavados antes de que se eluya el ccfDNA. Este enfoque de captura magnética evita problemas comunes como puntas obstruidas o transferencias parciales de reactivos que dan lugar a un procesamiento de purificación subóptimo por parte de otros sistemas automatizados de uso común.

2. Componentes del producto, condiciones de almacenamiento y leyenda de símbolos

PRODUCTO	TAMAÑO	CAT. #
Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit	48 preparaciones	AS1580

Para uso en diagnóstico in vitro. Solo para uso profesional. Contiene reactivos suficientes para 48 aislamientos automatizados de ccfDNA de muestras de plasma. Los cartuchos son de un solo uso.



Incluye:

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

Condiciones de almacenamiento: El Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit debe almacenarse a temperaturas entre +15 °C y +30 °C.



Información de seguridad: Consulte la ficha técnica de seguridad (SDS) para ver la información de seguridad detallada. Siga las directrices institucionales para la manipulación y eliminación de todos los residuos químicos utilizados con este sistema.



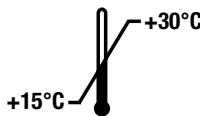
Los Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (CSCS) están diseñados para usarlos con sustancias potencialmente infecciosas. Debe llevar la protección adecuada (por ejemplo, guantes y gafas de seguridad) al manipular sustancias infecciosas. Siga las directrices institucionales de manipulación y eliminación de todas las sustancias infecciosas utilizadas en el sistema.



Precaución: Manipule los cartuchos con cuidado, los bordes del sistema de sellado podrían estar afilados.

Información adicional: Los componentes del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit son aptos para el uso conjunto y se han sometido a las pruebas de control de calidad pertinentes. No mezcle los componentes del kit entre diferentes lotes del mismo. Utilice únicamente los componentes proporcionados en el kit. Para obtener información sobre seguridad adicional, consulte la ficha técnica de seguridad disponible en: www.promega.com

Leyenda de símbolos

Símbolo	Explicación	Símbolo	Explicación
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Representante autorizado
	Se debe almacenar a temperaturas entre +15 °C y +30 °C.		Fabricante
	Precaución		Irritante
	Peligro para la salud		Válido para pruebas "n"
	Conformidad europea		Advertencia. Riesgos biológicos.
	Advertencia. Peligro de atrapamiento.		Número de catálogo
	Número de lote		No reutilizar

3. Finalidad del producto/uso previsto

El Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit está diseñado para usarse, en combinación con los Maxwell® CSC Instruments y el método Maxwell® CSC Rapid ccfDNA, como un dispositivo médico de diagnóstico in vitro (IVD) para realizar el aislamiento automatizado de ADN libre circulante (ccfDNA) de muestras de plasma humano. El ccfDNA purificado es adecuado para usarlo en análisis de diagnóstico in vitro basados en amplificación, incluida la PCR digital.

El Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit está diseñado para emplearse a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C. El uso fuera de este rango de temperatura puede provocar resultados no óptimos.

El Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit está diseñado solamente para uso profesional. Los resultados diagnósticos obtenidos mediante la purificación del ccfDNA con este sistema deberán interpretarse junto con otros datos clínicos o de laboratorio.

4. Limitaciones de uso del producto

La eficacia del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit se evaluó con muestras de plasma humano preparadas a partir de sangre total extraída en tubos Streck Cell-Free DNA BCT y tubos de extracción de sangre con anticoagulante K₂EDTA. El usuario es responsable de validar el uso del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit para purificar ccfDNA del plasma extraído en otros tubos de extracción de sangre.

La idoneidad del ácido nucleico purificado con el Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit para usarlo en la secuenciación de próxima generación (NGS) se demostró durante el desarrollo del producto, pero no se ha validado.

Deben incluirse los controles adecuados en cualquier aplicación de diagnóstico posterior que utilice ccfDNA purificado con el Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit. El usuario es responsable de establecer las características de rendimiento necesarias para las aplicaciones diagnósticas posteriores.

5. Preparación de muestras de plasma

Materiales que ha de aportar el usuario

- Sangre total o plasma
- Centrífuga de laboratorio

En el caso de la sangre total extraída en tubos con EDTA, la sangre debe procesarse inmediatamente después de la extracción o almacenarse a una temperatura de entre +2 °C y +10 °C hasta la preparación del plasma. Centrifugue la sangre total de los tubos con EDTA durante ≥10 minutos a ≥2000 × g para sedimentar los glóbulos rojos y blancos. En el caso de los dispositivos Streck Cell-Free DNA BCT®, siga las instrucciones del fabricante. Después de centrifugar por primera vez los tubos de extracción de sangre Streck Cell-Free DNA BCT® o con EDTA, use una pipeta para extraer con cuidado la mayor cantidad posible de plasma sin alterar la capa leucocítica y transfíralo a un tubo nuevo. Para asegurarse de que no se transfieran glóbulos blancos, centrifugue el plasma una segunda vez durante ≥10 minutos a ≥2000 × g y transfiera el sobrenadante a un tubo limpio.

Almacene el plasma a una temperatura de entre +2 °C y +10 °C durante un máximo de 1 semana. Para tiempos de almacenamiento más prolongados, conserve el plasma a una temperatura de entre -30 °C y -10 °C (o por debajo de los -65 °C). Evite exponer el plasma a ciclos de congelación y descongelación. Consulte la Sección 11.A para ver las consideraciones al utilizar plasma congelado.

6. Preparación de los Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges

1. Cambie de guantes antes de manipular los Maxwell® CSC cartridges, los émbolos CSC/RSC y los tubos de elución (0,5 ml). Coloque los cartuchos que se van a utilizar en las bandejas de la plataforma Maxwell® CSC/RSC con el pocillo n.º 1 (el primero de los pocillos más grandes del cartucho) en dirección contraria a los tubos de elución. Presione hacia abajo el cartucho para encajarlo en su sitio. Tire cuidadosamente del sistema de sellado para retirarlo por completo de la parte superior del cartucho. Asegúrese de haber eliminado toda la cinta de sellado y el adhesivo residual antes de colocar los cartuchos en el instrumento.



Precaución: Manipule los cartuchos con cuidado. Los bordes del sistema de sellado podrían estar afilados.

2. Según el volumen total de la muestra de plasma, transfiera el plasma solo al pocillo n.º 1 (el primer pocillo más grande), solo a los pocillos n.º 1 y n.º 3 (el primer y el tercer pocillo más grande) o a los pocillos n.º 1, n.º 2 y n.º 3 (los tres pocillos más grandes) del cartucho del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA, como se indica en la Tabla 2. Cambie las puntas de la pipeta entre diferentes muestras de plasma para evitar la contaminación cruzada.

Tabla 2. Transferencia de muestras de plasma a diferentes pocillos del Maxwell® CSC Cartridge según el volumen de entrada de la muestra.

Volumen de la muestra (ml)	Instrucciones para transferir muestras
1,0 ml a 1,5 ml de plasma	Agregue plasma solo al pocillo n.º 1. Consulte la Figura 1, Panel A.
>1,5 ml a ≤3,0 ml de plasma	Agregue volúmenes iguales de plasma a los pocillos n.º 1 y n.º 3. Consulte la Figura 1, Panel B.
3,0 ml a 4,0 ml de plasma	Agregue volúmenes iguales de plasma a los pocillos n.º 1, n.º 2 y n.º 3. Consulte la Figura 1, Panel C.

Notas:

- **No dispense más de 1,5 ml de plasma por pocillo.**
- **Con volúmenes de entrada de plasma de 1,0 ml a 1,5 ml, toda la muestra de plasma debe cargarse solo en el pocillo n.º 1.** La carga de plasma en el pocillo n.º 2 o n.º 3 afectará negativamente la recuperación de ccfDNA.
- **Con volúmenes de entrada de plasma de 1,5 ml a 3,0 ml, el plasma debe cargarse solo en los pocillos n.º 1 y n.º 3.** La carga de plasma en cualquier otra configuración de pocillo (p. ej., en los pocillos n.º 2 y n.º 3 o en los pocillos n.º 1 y n.º 2) afectará negativamente la recuperación de ccfDNA.

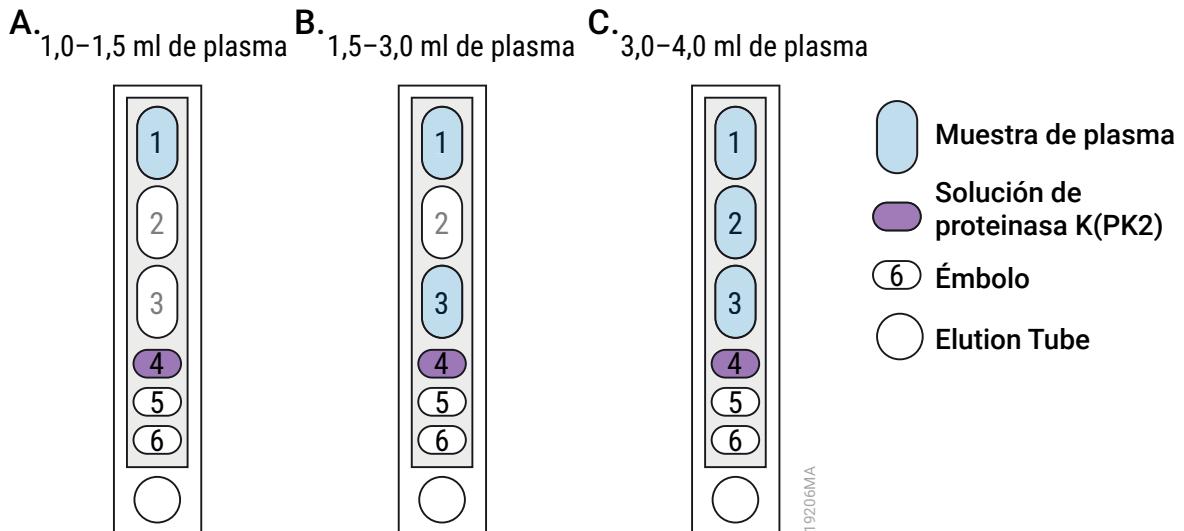


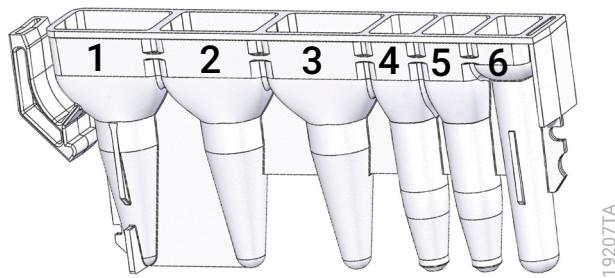
Figura 1. La transferencia de muestras de plasma a diferentes pocillos del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge se basa en el volumen de entrada de la muestra. Para muestras de plasma de 1,0 ml a 1,5 ml, transfiera toda la muestra al pocillo n.º 1 (**Panel A**). Para muestras de plasma de 1,5 ml a 3,0 ml, transfiera volúmenes iguales de plasma a los pocillos n.º 1 y n.º 3 (**Panel B**). Para muestras de plasma de 3,0 ml a 4,0 ml, transfiera volúmenes iguales de plasma a los pocillos n.º 1, n.º 2 y n.º 3 (**Panel C**). Dispense 10 µl de la solución de proteinasa K (PK2) en el pocillo n.º 4. Agregue 50 µl de Elution Buffer (RCFD) al Elution Tube (representado por el círculo en la parte inferior de cada uno de los paneles). Coloque un émbolo en el pocillo n.º 6.

3. Dispense 10 µl de la solución de proteinasa K (PK2) en el pocillo n.º 4.
4. Coloque un émbolo en el pocillo n.º 6 de cada cartucho.
5. Coloque un Elution Tube vacío en la posición correspondiente para cada cartucho en la bandeja de la plataforma. Agregue 50 µl de Elution Buffer (RCFD) al fondo de cada Elution Tube.
6. Continúe en la sección 7, Configuración y ejecución del Maxwell® Instrument.

Notas:

- a. Los derrames de muestras o reactivos en cualquier parte de la bandeja de plataforma deberán limpiarse con una solución de agua y detergente y, posteriormente, con un spray o paño bactericida seguidos por agua. No use lejía en ninguna de las piezas del Maxwell® Instrument.
- b. Utilice únicamente los Elution Tubes de 0,5 ml proporcionados en el kit. Es posible que otros tipos de tubos sean incompatibles con el Maxwell® Instrument.
- c. El Elution Buffer (RCFD) suministrado es esencial para una recuperación eficiente de ccfDNA. No reemplace el Elution Buffer (RCFD) con tampones de elución alternativos. El uso de tampones de elución alternativos afectará negativamente la recuperación de ccfDNA.
- d. Se pueden lograr concentraciones más altas de ccfDNA con menos de 50 µl de Elution Buffer (RCFD), pero el rendimiento total puede ser menor.

6. Preparación de los Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (continuación)



19207TA

Adiciones del usuario a los pocillos:

1. Muestra de plasma (consulte la Tabla 2 y la Figura 1 para obtener más información).
o bien
- 1.,3. Muestra de plasma
o bien
- 1.,2.,3. Muestra de plasma
4. Solución de proteinasa K (PK2)
6. CSC/RSC Plunger

Figura 2. Maxwell® CSC Cartridge. La muestra de plasma se agrega al pocillo n.º 1 (1,0 ml a 1,5 ml de muestra), a los pocillos n.º 1 y n.º 3 (1,5 ml a 3,0 ml de muestra) o a los pocillos n.º 1, n.º 2 y n.º 3 (3,0 ml a 4,0 ml de muestra), según el volumen de la muestra; se dispensan 10 µl de solución de proteinasa K (PK2) en el pocillo n.º 4 y se agrega un émbolo al pocillo n.º 6.



19208TA

Figura 3. Preparación y configuración de las bandejas de plataforma. Se agrega el Elution Buffer (RCFD) a los tubos de elución como se indica. Los émbolos se encuentran en la posición n.º 6 del cartucho. La bandeja de plataforma se muestra desde el Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000).

7. Configuración y ejecución del Maxwell® Instrument

Para obtener información detallada, consulte el Manual de uso específico de su Maxwell® CSC Instrument. Consulte la tabla 1.

1. Encienda el Maxwell® Instrument y el Tablet PC. Regístrese en el Tablet PC e inicie el software del Maxwell® CSC IVD-mode tocando dos veces el ícono del escritorio. El instrumento realizará las autocomprobaciones y colocará todas las piezas en la posición de inicio.
2. Seleccione **Iniciar** en la pantalla “Inicio”.
3. Escanee o introduzca el código de barras que figura en la esquina superior derecha de la etiqueta del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit y seleccione **Aceptar** para seleccionar automáticamente el método para ejecutar (Figura 4).

Nota: Se requiere el código de barras del método del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit para la purificación de ccfDNA en los Maxwell® CSC Instruments. La etiqueta del kit contiene dos códigos de barras. El código de barras del método se indica en la Figura 4. Si no puede escanearse el código de barras, póngase en contacto con Promega Technical Services.



Figura 4. Etiqueta del kit que indica el código de barras que debe escanearse. El código de barras que debe escanearse para iniciar una purificación se muestra en el cuadro azul, en la esquina superior derecha de la etiqueta del kit.

4. En la pantalla “Configuración de cartucho”, corrobore que el método Maxwell® CSC Rapid ccfDNA aparezca en la parte superior de la pantalla. Seleccione las posiciones de cartuchos para seleccionar cualquier posición que se utilizará para esta extracción o para anular su selección. Introduzca cualquier información de seguimiento de muestras necesaria y seleccione el botón **Continuar** para seguir.

Nota: Con el Maxwell® CSC 48 Instrument, seleccione o deseccione las posiciones de los cartuchos en cada bandeja de plataforma utilizando los botones **Parte frontal** y **Parte trasera**.

7. Configuración y ejecución del Maxwell® Instrument (continuación)

5. Una vez abierta la puerta, confirme que se hayan realizado todos los elementos de la lista de comprobación de extracción. Verifique que las muestras de plasma se hayan agregado a los pocillos adecuados de los cartuchos, que la solución de proteinasa K (PK2) se haya agregado al pocillo n.º 4 del cartucho, que los émbolos estén en el pocillo n.º 6, que los cartuchos estén cargados en el instrumento y que los tubos de elución sin tapa se encuentren con el Elution Buffer (RCFD). Transfiera las bandejas de plataforma que contengan los cartuchos preparados a la plataforma del Maxwell® Instrument.

Introducción de las bandejas de plataforma Maxwell®: Sostenga la bandeja de plataforma por los laterales para evitar que los cartuchos se salgan de esta. Asegúrese de que la bandeja de plataforma se coloque en el Maxwell® Instrument con los tubos de elución próximos a la puerta. Dirija la parte posterior de la bandeja de plataforma hacia abajo y colóquela en el instrumento, de modo que esta toque la parte posterior de la plataforma del instrumento. Presione hacia abajo en la parte frontal de la bandeja de plataforma para asentar firmemente la bandeja de plataforma en la plataforma del instrumento. Si tiene dificultades para encajar la bandeja en la plataforma, compruebe que esta se encuentre en la orientación correcta. Asegúrese de que la bandeja de plataforma esté nivelada en la plataforma del instrumento y completamente asentada.

Nota: Compruebe el identificador de las bandejas de plataforma Maxwell® de 24 posiciones para determinar si deben colocarse en la parte frontal o posterior del instrumento.

6. Seleccione el botón **Inicio** para comenzar la extracción. La plataforma se retraerá y se cerrará la puerta.



Advertencia: Peligro de aprisionamiento.

Nota: Al usar un Maxwell® Instrument de 48 posiciones y si se ha activado el Vision System, las bandejas de plataforma se escanean mientras se retrae la plataforma. Cualquier error en la configuración de las bandejas de plataforma (p. ej., los émbolos no están en el pocillo n.º 6 o los tubos de elución no están presentes y abiertos) provocará que el software vuelva a la pantalla "Configuración de cartucho" y las posiciones con problemas se marcarán con un signo de exclamación en un círculo rojo. Seleccione el signo de exclamación para ver una descripción del error y resolver todos los estados de error. Vuelva a seleccionar el botón **Inicio** para repetir el escaneo de las bandejas de plataforma y comenzar la ejecución de extracción.

7. El Maxwell® Instrument iniciará de forma inmediata la purificación. La pantalla mostrará los pasos realizados y el tiempo aproximado restante de ejecución.

Notas:

- a. Al seleccionar el botón **Cancelar**, se abandonará la ejecución. Se perderán todas las muestras de una ejecución cancelada.
 - b. Si se cancela la ejecución antes de que finalice, puede que se le pida que compruebe si sigue habiendo émbolos cargados en la barra de émbolo del Maxwell® Instrument. Si hay émbolos presentes en la barra de émbolo, ejecute **Retirada de émbolos** cuando se le pida. Si no hay émbolos presentes en la barra de émbolo, puede elegir omitir **Retirada de émbolos** cuando se le pida. Se perderán las muestras.
8. Cuando haya terminado la ejecución, la interfaz de usuario mostrará un mensaje indicando que el método ha finalizado.

Fin de la ejecución

9. Para abrir la puerta, siga las instrucciones en pantalla que aparecen al final del método. Verifique que los émbolos se encuentren en el pocillo n.º 6 del cartucho al final de la ejecución. Si no se han retirado los émbolos de la barra de émbolo, siga las instrucciones del manual técnico de su Maxwell® Instrument (consulte la Tabla 1) para ejecutar el proceso **Retirada de émbolos** para intentar descargar los émbolos.
10. Retire las bandejas de plataforma del instrumento inmediatamente después de la ejecución para evitar que se evaporen los eluidos. Retire los tubos de elución que contengan ccfDNA y tape los tubos.
Asegúrese de que las muestras de ácido nucleico purificado se retiren del instrumento antes de ejecutar un protocolo de desinfección por UV para evitar daños al ácido nucleico.
11. Retire los cartuchos y los émbolos de las bandejas de plataforma Maxwell®. Deséchelos como residuos peligrosos siguiendo los procedimientos institucionales. No reutilice Maxwell® CSC Cartridges, los CSC/RSC Plungers ni los Elution Tubes.



8. Después de la purificación

Compruebe que la muestra de ccfDNA purificado cumple los requisitos para el análisis de diagnóstico posterior adecuado antes de usarla en este análisis. Si las muestras de ccfDNA purificadas no se procesan inmediatamente, almacénelas a 4 °C hasta 7 días. Para un almacenamiento más prolongado, congélelas a -20 °C o -70 °C o menos. Para conocer las recomendaciones específicas de manipulación y de almacenamiento de muestras de ccfDNA, consulte las instrucciones de las aplicaciones posteriores.

9. Evaluación del rendimiento analítico

El rendimiento analítico del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit se evaluó utilizando muestras de plasma humano procesadas en los Maxwell® CSC y Maxwell® CSC 48 Instruments. Se evaluaron métricas clave como la cantidad, la calidad, la amplificabilidad, la reproducibilidad y la contaminación cruzada del ccfDNA para confirmar la fiabilidad e idoneidad del ccfDNA extraído utilizando el Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit para aplicaciones posteriores.

9.A. Cantidad y calidad del ccfDNA

Las muestras de plasma se aislaron de la sangre de seis personas recolectadas en tubos K₂EDTA o en dispositivos Streck Cell-Free DNA BCT®. El ccfDNA se extrajo de 1 ml a 4 ml de muestras de plasma con el Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit. La cantidad y la calidad del ccfDNA se evaluaron mediante el análisis TapeStation (Agilent Technologies, Inc.) de una réplica biológica por condición, centrándose en el porcentaje de ADN libre de células (cfDNA) y el tamaño máximo de ADN más grande, que refleja la calidad del fragmento. El porcentaje de cfDNA se refiere a la proporción de fragmentos de ADN dentro del intervalo de 50 pb a 700 pb en relación con el contenido total de ADN en la muestra purificada, según lo determinado mediante el análisis TapeStation. Este valor proporciona una medida del enriquecimiento de la muestra para el ccfDNA, que suele ser de menor tamaño debido a su origen a partir del ADN fragmentado liberado después de la muerte celular.

El análisis de TapeStation indicó que el intervalo porcentual del ccfDNA fue de 76 % a 93 %, con los tamaños máximos más grandes entre 177 pb y 203 pb en todas las muestras de ccfDNA purificadas. No hubo diferencias significativas en la proporción o calidad del ccfDNA extraído de plasma recolectado en diferentes tubos de anticoagulante o distintos volúmenes de entrada de muestra de plasma.

Tabla 3. Análisis de TapeStation del ccfDNA purificado que muestra el porcentaje de ADN libre de células y el tamaño máximo más grande en varios volúmenes de entrada de muestra de plasma y anticoagulantes.

ID de la muestra (anticoagulante)	Volumen de entrada de la muestra de plasma (ml)	Porcentaje de ADN libre de células	Tamaño más grande máximo (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 de la muestra (anticoagulante)	Volumen de entrada de la muestra de plasma (ml)	Porcentaje de ADN libre de células	Tamaño más grande máximo (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. Amplificabilidad e inhibición (sustancias interferentes)

La amplificabilidad y la falta de inhibición del ccfDNA purificado se evaluaron mediante un ensayo de qPCR para amplificar un ADN diana de 75 pb y analizar los datos de qPCR para detectar cualquier inhibición. El ccfDNA se extrajo por cuadruplicado de cada una de las muestras de plasma humano de 4 ml recolectadas de seis personas en tubos K₂EDTA o dispositivos Streck Cell-Free DNA BCT®. Cada muestra de ccfDNA extraída se analizó mediante el ensayo de qPCR. Los valores medios del control positivo interno (IPC) |ΔC_q| se calcularon en relación con el estándar de qPCR, cuya concentración era la más cercana a la de la muestra de ccfDNA amplificada por qPCR para determinar el grado de inhibición.

Los resultados de qPCR (Tabla 4) indicaron una inhibición de la amplificación mínima o nula, como es evidente a partir de los valores medios de IPC |ΔC_q| ≤0,5 para todas las muestras de ccfDNA purificadas.

Tabla 4. Evaluación de la inhibición tras la amplificación de ccfDNA extraído de muestras de plasma humano de 4 ml.

ID de la muestra (anticoagulante)	IPC medio ΔC _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. Cuantificación del ccfDNA mediante tinción fluorescente y PCR cuantitativa

La consistencia de la cuantificación del ccfDNA se evaluó comparando las concentraciones de ccfDNA con un método basado en un tinte fluorescente específico de ADN bicatenario y un ensayo de qPCR que amplificó un objetivo de ADN de 75 pb. Se utilizaron muestras de ccfDNA extraídas por cuadruplicado de 4 ml de muestras de plasma humano que se recolectaron de seis personas en tubos K₂EDTA o en el dispositivo Streck Cell-Free DNA BCT® para los análisis. Se calcularon las proporciones de la cuantificación del ccfDNA basada en fluorescencia con respecto a la cuantificación del ccfDNA basada en qPCR.

Los resultados demostraron una gran correlación entre los dos métodos de cuantificación, con proporciones de concentración de ccfDNA que oscilaron entre 0,7 y 1,4 en todas las muestras.

Tabla 5. Comparación de la concentración de ccfDNA con métodos de cuantificación basados en fluorescencia y qPCR.

ID de la muestra (anticoagulante)	Relación de concentración de fluorescencia a 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. Reproducibilidad

La reproducibilidad de la extracción de ccfDNA mediante el Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit se evaluó analizando el coeficiente de variación porcentual (CV) dentro de la ejecución y entre ejecuciones para el rendimiento del ccfDNA. Se utilizaron 4 ml de plasma recolectado en anticoagulante K₂EDTA para extraer el ccfDNA mediante tres ejecuciones de extracción consecutivas con los Maxwell® CSC y Maxwell® CSC 48 Instruments. Cada ejecución de extracción produjo 24 eluidos de ccfDNA. El rendimiento del ccfDNA se cuantificó utilizando un ensayo de qPCR que amplificó un objetivo de ADN de 75 pb.

Los resultados mostraron que los valores de CV porcentuales dentro de la ejecución fueron del 11 % y 14 % para el Maxwell® CSC Instrument y el Maxwell® CSC 48 Instrument, respectivamente. Los valores de CV porcentuales entre ejecuciones fueron del 5 % para ambos instrumentos.

Tabla 6. Variabilidad dentro de la ejecución y entre ejecuciones en el rendimiento de ccfDNA.

Instrumento	Anticoagulante	Volumen de entrada de la muestra de plasma (ml)	Coeficiente porcentual de variación dentro de la ejecución	Coeficiente porcentual de variación entre ejecuciones
Maxwell® CSC	K ₂ EDTA	4	11 %	5 %
Maxwell® CSC 48	K ₂ EDTA	4	14 %	5 %

9.E. Contaminación cruzada

Se evaluó el potencial de contaminación cruzada durante la extracción de ccfDNA con el Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit mediante el procesamiento de muestras de plasma humano y bovino colocadas en posiciones alternas de las plataformas de los Maxwell® CSC y Maxwell® CSC 48 Instruments. Se analizaron los eluidos de ccfDNA de plasma bovino para detectar la presencia de ADN humano contaminante mediante un ensayo de qPCR que amplificó un ADN diana de 75 pb específico de humanos para determinar toda contaminación cruzada.

Cuando se procesaron muestras de plasma humano en posiciones de las plataformas del Maxwell® Instrument adyacentes a muestras de plasma bovino, ninguno de los eluidos de ccfDNA bovino exhibió cantidades cuantificables de ADN humano en el ensayo de qPCR, lo que confirmó la ausencia de toda contaminación cruzada detectable.

9.F. Compatibilidad con la secuenciación de próxima generación

Se evaluó la compatibilidad de los eluidos de ccfDNA con los flujos de trabajo de secuenciación de próxima generación (NGS) mediante la preparación de la colección de ccfDNA seguida del análisis de TapeStation. El ccfDNA se extrajo de muestras de plasma recolectadas en tubos K₂EDTA o en dispositivos Streck Cell-Free DNA BCT® utilizando el Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit con el Maxwell® CSC o Maxwell® CSC 48 Instrument. La preparación exitosa de la colección se determinó observando un cambio característico en el par de bases del adaptador en el análisis de TapeStation.

Todas las colecciones de ccfDNA evaluadas demostraron el cambio esperado en el par de bases del adaptador, lo que confirma la preparación exitosa de la colección de NGS.

9.G. Compatibilidad con PCR digital

La compatibilidad de los eluidos de ccfDNA con el flujo de trabajo de PCR digital (dPCR) se evaluó mediante un ensayo de PCR digital de gotas. El estudio incluyó muestras de ccfDNA extraídas de plasma humano recolectadas en tubos K₂EDTA y dispositivos Streck Cell-Free DNA BCT®, con volúmenes de entrada de muestra de plasma de 3 ml y 4 ml. Los eluidos de ccfDNA se evaluaron utilizando un ensayo de variación del número de copias (gen PIK3CA) y se registraron los recuentos de gotas.

Los resultados demostraron una amplificación exitosa en todas las muestras de ccfDNA analizadas, con recuentos de gotas superiores a 15 000 por reacción.

10. Evaluación de la eficacia clínica

La eficacia clínica del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit se evaluó en un laboratorio clínico externo con muestras de plasma humano procesadas con el Maxwell® CSC 48 Instrument.

En el primer estudio, dos evaluadores purificaron independientemente el ccfDNA de muestras de plasma humano de 1,5 ml (n = 10) por medio del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit y del método de purificación estándar utilizado por el laboratorio como referencia. Los eluidos de ccfDNA resultantes se analizaron para el factor Rhesus mediante un ensayo basado en amplificación. El ccfDNA extraído de muestras de plasma humano por medio del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit mostró los resultados esperados, que fueron congruentes con los resultados obtenidos con el ccfDNA extraído por el método de referencia de laboratorio.

En el segundo estudio, dos evaluadores purificaron independientemente ccfDNA de muestras de plasma humano de 1,5 ml (n = 10) con el Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit. Los eluidos de ccfDNA purificados se analizaron para el factor Rhesus mediante un ensayo basado en amplificación y se obtuvieron resultados congruentes entre los dos evaluadores.

11. Consideraciones al trabajar con ccfDNA

11.A. Preparación del plasma

Un problema potencial al purificar ccfDNA es la presencia de ADN genómico contaminante de glóbulos blancos lisados. El plasma se suele centrifugar dos veces; la primera centrifugación elimina los glóbulos rojos y blancos, y la segunda centrifugación elimina los glóbulos blancos residuales. Si la muestra de sangre se incubó durante períodos prolongados a temperatura ambiente, o se congeló y descongeló antes del procesamiento, es posible que algunos glóbulos blancos se hayan lisado, lo cual libera ADN genómico en el plasma.

Si la muestra de plasma se congeló, puede generarse crioprecipitado después de la descongelación. Si bien el crioprecipitado no tiene ningún efecto sobre la purificación del ccfDNA con el Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit, puede afectar el pipeteo del plasma. Para sedimentar el crioprecipitado, centrifugue la muestra de plasma a $\geq 1000 \times g$ durante ≥ 5 minutos antes del procesamiento.

11.B. Recomendaciones para la cuantificación del ccfDNA

La baja concentración y la naturaleza fragmentada del ccfDNA plantean desafíos singulares. En el plasma de humanos sanos, los rendimientos de 5 ng a 30 ng de ccfDNA por mililitro de plasma son típicos. La mayoría de los fragmentos de ccfDNA tienen aproximadamente entre 160 pb y 200 pb, con fragmentos adicionales de aproximadamente 340 pb y 510 pb.

Cuantificación UV

Resulta difícil determinar con precisión la concentración de ccfDNA utilizando la absorbancia de 260 nm por la baja concentración. Algunos productos utilizan un ARN portador para mejorar la purificación del ccfDNA. El ARN portador se encuentra en una abundancia mucho mayor que el ccfDNA y se copurifica. Esto puede dar un valor A_{260} falso y concentraciones aparentes de ccfDNA drásticamente más altas. Para una cuantificación precisa, utilice colorantes fluorescentes o PCR.

Cuantificación basada en fluorescencia

La alta sensibilidad de los colorantes específicos de ADN bicatenario los convierte en una mejor opción para cuantificar el ccfDNA, pero existen dos preocupaciones. La primera tiene que ver con el ARN portador. Si bien los colorantes específicos de ADN bicatenario tienen una especificidad mucho mayor para el ADN que para el ARN, los altos niveles de ARN portador en otros kits de ccfDNA pueden incrementar los valores de la unidad de fluorescencia relativa (RFU), lo que hace que las concentraciones de ccfDNA parezcan más altas que sus valores reales.

Un segundo factor es que los estándares utilizados con los colorantes fluorescentes suelen ser ADN genómico o Lambda de alto peso molecular. El ccfDNA está muy fragmentado y tiene un peso molecular relativamente bajo. Por lo tanto, no se une a los colorantes fluorescentes con tanta eficacia como el ADN de alto peso molecular, lo que da lugar a concentraciones aparentes más bajas. Si es posible, utilice estándares de ADN de menor peso molecular para obtener una cuantificación más precisa.

Cuantificación basada en amplificación

La cuantificación de ccfDNA más precisa se obtiene mediante qPCR o PCR digital. Además de la sensibilidad, la cuantificación basada en amplificación puede indicar la idoneidad de las muestras para aplicaciones posteriores basadas en amplificación.

12. Solución de problemas

En caso de que tenga alguna duda que no resuelva esta sección, póngase en contacto con su distribuidor o sucursal local de Promega. Puede obtener información de contacto en: www.promega.com. Correo electrónico: techserv@promega.com

Síntomas	Causas y comentarios
El instrumento no puede recoger los émbolos	Asegúrese de utilizar un kit de química específico para Maxwell® CSC; los émbolos de los kits Maxwell® CSC son específicos para los Maxwell® Instruments compatibles (consulte la Tabla 1).
Bajo rendimiento del ccfDNA	<p>El Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit puede aceptar un máximo de 4 ml de muestra de plasma. Repita la extracción utilizando hasta 4 ml de plasma.</p> <p>Si se utiliza menos de 1 ml de plasma, la recuperación del ccfDNA puede verse afectada negativamente.</p>
	<p>Corrobore que se haya añadido el volumen correcto de solución de proteinasa K (PK2) al pocillo n.º 4 del cartucho. Repita la extracción después de dispensar 10 µl de solución de proteinasa K (PK2) en el pocillo n.º 4.</p> <p>Los rendimientos se pueden reducir si se eluye en menos de 50 µl de Elution Buffer (RCFD). Repita la extracción utilizando 50 µl de Elution Buffer (RCFD).</p>
	<p>El Elution Buffer (RCFD) suministrado es esencial para una recuperación eficiente de ccfDNA. No reemplace el Elution Buffer (RCFD) con tampones de elución alternativos. Repita la extracción utilizando el Elution Buffer (RCFD).</p> <p>Confirme que el plasma se transfirió a los pocillos correctos del Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge (consulte la Tabla 2 y la Figura 1 en la Sección 6).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Para volúmenes de entrada de plasma de 1,0 ml a 1,5 ml, transfiera todo el plasma al pocillo n.º 1. • Para volúmenes de entrada de plasma de 1,5 a 3,0 ml, divida el volumen de plasma en partes iguales entre los pocillos n.º 1 y n.º 3. • Para volúmenes de entrada de plasma de 3,0 ml a 4,0 ml, agregue volúmenes iguales de plasma a los pocillos n.º 1, n.º 2 y n.º 3.
Contaminación del ADN genómico	La preparación de plasma contiene glóbulos blancos lisados. Consulte las secciones 5 y 11.A para obtener recomendaciones sobre la preparación de muestras de plasma a partir de sangre total.

Cualquier incidente grave ocurrido en relación con el dispositivo que haya provocado o pueda provocar la muerte o lesiones graves de un usuario o paciente debe notificarse inmediatamente al fabricante. Los usuarios ubicados en la Unión Europea también deben notificar cualquier incidente grave a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.

13. Productos relacionados

Producto	Tamaño	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	1 unidad	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 unidad	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 unidad	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 unidad	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 unidad	AS8402
RSC/CSC Plungers	50/paquete	AS1331
Elution Tubes (0,5 ml)	50/paquete	AS6201
Elution Magnet, 16 posiciones	1 unidad	AS4017
Elution Magnet, 24 posiciones	1 unidad	AS4018

* Producto sanitario para diagnóstico in vitro. Este producto solamente está disponible en algunos países.

Maxwell® CSC Reagent Kits

Visite www.promega.com para obtener una lista de los kits de extracción Maxwell® CSC disponibles.

© 2025 Promega Corporation. Todos los derechos reservados.

Maxwell es una marca registrada de Promega Corporation.

Cell-Free DNA BCT es una marca registrada de Streck LLC.

Estos productos podrían estar protegidos mediante patentes emitidas o pendientes, o podrían tener algunas limitaciones. Para obtener más información, visite nuestro sitio web.

Todos los precios y especificaciones de este manual están sujetos a cambios sin previo aviso.

Las declaraciones sobre los productos están sujetas a cualquier cambio. Póngase en contacto con Promega Technical Services o acceda al catálogo en línea de Promega para obtener la información más actual sobre los productos Promega.