

MANUAL TÉCNICO

Maxwell[®] CSC RNA Blood Kit

Instrucciones de uso del producto
AS1410

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

Maxwell[®] CSC RNA Blood Kit

Toda la documentación técnica está disponible en: www.promega.com/protocols/
 Visite el sitio web para verificar que está utilizando la versión más actualizada 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. Antes de empezar: Preparación de las soluciones	6
6. Purificación de ARN de sangre completa fresca en tubos de EDTA.....	6
6.A. Preprocesamiento de muestras de sangre completa	7
6.B. Preparación del Maxwell [®] CSC RNA Blood Cartridge	8
7. Ejecución del instrumento	10
8. Después de la purificación	12
9. Evaluación del rendimiento analítico	13
9.A. Cantidad y calidad de ARN	13
9.B. Amplificabilidad de ARN	14
9.C. Reproducibilidad.....	14
9.D. Inhibición (sustancias interferentes).....	15
9.E. Contaminación Cruzada	15
10. Evaluación del rendimiento clínico.....	15
10.A. Cantidad, calidad y amplificabilidad del ARN.....	16
10.B. Reproducibilidad.....	17
10.C. Contaminación Cruzada	17
11. Solución de problemas	18
12. Creación de un entorno sin ribonucleasa.....	20
13. Bibliografía	21
14. Productos relacionados	21
15. Resumen de las modificaciones	22

El Maxwell® CSC RNA Blood Kit solo está disponible en algunos países.

1. Descripción

El Maxwell® CSC RNA Blood Kit^(a) se utiliza junto con los Maxwell® Instruments especificados en la tabla 1 para proporcionar un método sencillo de purificación eficaz y automatizada de ARN a partir de sangre completa humana fresca (no congelada) recogida en tubos de EDTA. Los Maxwell® CSC Instruments están diseñados para utilizarse con cartuchos de reactivos predispensados y reactivos adicionales suministrados en el kit con métodos de purificación preprogramados, para una máxima sencillez y comodidad. Los Maxwell® CSC Instruments pueden procesar desde una hasta el número máximo de muestras permitidas en aproximadamente 60 minutos, y el ARN purificado puede utilizarse directamente en diversas aplicaciones posteriores basadas en amplificación, por ejemplo, RT-PCR.

Tabla 1. Instrumentos compatibles.

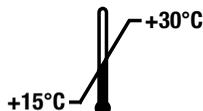
Instrumento	Cat. #	Manual técnico
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Principio del método: El Maxwell® CSC RNA Blood Kit purifica el ARN mediante partículas paramagnéticas, que proporcionan una fase sólida móvil para optimizar la recogida de muestras, el lavado y la purificación del ARN. Los Maxwell® CSC Instruments se ocupan de las partículas utilizando métodos magnéticos. Este sistema permite que el ARN se adhiera eficazmente a las partículas paramagnéticas del primer pocillo de un cartucho prerrellenado y mueve la muestra por los pocillos del cartucho. Este enfoque de captura magnética evita los problemas comunes asociados a los sistemas de manejo de líquidos, como, por ejemplo, la obturación de las puntas o la transferencia parcial de reactivos, que dan lugar a un proceso de purificación poco adecuado en otros sistemas de uso frecuente.

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

PRODUCTO	TAMAÑO	CAT.#
Maxwell® CSC RNA Blood Kit	48 preps	AS1410

Para uso en diagnóstico in vitro. Solo para uso profesional. Válido para 48 aislamientos automatizados de muestras de sangre. Los Maxwell® CSC Cartridges son de un solo uso.



Incluye:

- 48 Maxwell® CSC RNA Blood Cartridges
- 4 × 100 ml Solution A
- 30 ml Solution B
- 20 ml Lysis Buffer
- 2 viales DNase I (lyophilized)
- 900 µl 1-Thioglycerol
- 100 µl Blue Dye
- 2 × 1 ml Proteinase K (PK) Solution
- 25 ml Nuclease-Free Water
- 50 CSC/RSC Plungers
- 50 Elution Tubes (0,5 ml)

Condiciones de almacenamiento: Al recibirlo, retire el 1-tioglicerol y almacénelo a una temperatura entre +2 °C y +10 °C. Almacene los demás componentes del kit a temperatura ambiente (+15 °C a +30 °C). El 1-tioglicerol puede almacenarse a temperatura ambiente (+15 °C a +30 °C), donde permanecerá estable hasta 9 meses. Almacene la ADNasa I rehidratada entre -30 °C y -10 °C. No supere los 10 ciclos de congelación-descongelación.

 **Información de seguridad:** Los cartuchos contienen etanol, que es inflamable. El 1-tioglicerol es tóxico. El tiocianato de guanidina y el clorhidrato de guanidina (componentes de la solución B y del tampón lítico) son dañinos e irritantes. Utilice guantes y siga los procedimientos de seguridad estándar mientras trabaje con estas sustancias.

 Los componentes del Maxwell® CSC RNA Blood Kit están diseñados para su uso con sustancias potencialmente infecciosas. Los usuarios deberán llevar un equipo de protección individual adecuado (por ejemplo, guantes, una bata de laboratorio y gafas) cuando manipulen sustancias infecciosas. Los usuarios deberán seguir las directrices institucionales de manipulación y eliminación de todas las sustancias infecciosas utilizadas en el sistema.

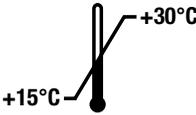
 **Nota:** La lejía reacciona con el cloruro de amonio y el tiocianato de guanidina, y produce gases tóxicos. El cloruro de amonio y el tiocianato de guanidina están presentes en las soluciones A y B, respectivamente. No descontamine los desechos de este kit con lejía.

 **Precaución:** Maneje los cartuchos y el vial abierto de ADNasa I liofilizada con cuidado, los bordes podrían estar afilados.

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

Información adicional: Los componentes del Maxwell® CSC RNA Blood Kit son aptos para el uso conjunto y se han sometido a las pruebas de control de calidad pertinentes. No se recomienda mezclar componentes de kits distintos. Utilice únicamente los componentes proporcionados en el kit. No utilice los cartuchos si el sellado no está intacto al recibirlo. Para obtener información de 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.		Venenosos
	Corrosivo		Válido para "n" pruebas
	Conformidad europea		Advertencia. Riesgos biológicos.
	Advertencia. Peligro de aprisionamiento.		Número de catálogo
	Código de lote		No reutilizar

3. Finalidad del producto/uso previsto

El Maxwell® CSC RNA Blood Kit está diseñado para utilizarse, junto con los Maxwell® CSC Instruments y el método de purificación Maxwell® CSC RNA Blood, como producto sanitario para diagnóstico in vitro (IVD) para realizar un aislamiento automatizado del ARN de 2,5 ml de sangre completa humana recogida en tubos de EDTA con un recuento leucocitario de entre 4×10^6 a 10×10^6 leucocitos por mililitro. El ARN purificado es adecuado para el uso en análisis de diagnóstico in vitro basados en amplificación.

El Maxwell® CSC RNA Blood Kit está diseñado para utilizarse con 2,5 ml de sangre completa humana.

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

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

4. Limitaciones de uso del producto

El Maxwell® CSC RNA Blood Kit está diseñado solamente para utilizarse con muestras de sangre completa humana recogida en tubos de EDTA. No está diseñado para utilizarse con muestras de sangre no completa, como la médula ósea o la capa leucocitaria, ni con muestras almacenadas en otros tubos de recolección.

El Maxwell® CSC RNA Blood Kit no está diseñado para utilizarse con muestras no humanas ni para la purificación de ADN.

Se ha evaluado el rendimiento del Maxwell® CSC RNA Blood Kit para aislar el ARN de 2,5 ml de sangre completa humana en tubos de EDTA.

El usuario es responsable de establecer las características de rendimiento necesarias para las aplicaciones diagnósticas posteriores. Deben incluirse los controles apropiados en cualquier aplicación diagnóstica posterior que utilice ARN purificado mediante el Maxwell® CSC RNA Blood Kit.

5. Antes de empezar: Preparación de las soluciones

1-tioglicerol/solución B

Prepare una mezcla de 1-tioglicerol/solución B a través de uno de los siguientes métodos:

Añada 600 µl de 1-tioglicerol al frasco de solución B y mezcle completamente. El 1-tioglicerol es viscoso, por lo que hay que pipetearlo con cuidado para conseguir una medición precisa. Antes de usar la mezcla de 1-tioglicerol/solución B, enfríela en hielo o entre 2–10 °C.

De forma alternativa, prepare volúmenes más pequeños añadiendo 20 µl de 1-tioglicerol por milímetro de solución B. Prepare 200 µl de 1-tioglicerol/solución B enfriada para cada muestra.

Nota: Almacene el preparado de 1-tioglicerol/solución B entre 2–10 °C, donde permanecerá estable hasta 30 días.

ADNasa I

Añada 275 µl de Nuclease-Free Water al vial de ADNasa I liofilizada. Inviértalo para enjuagar la ADNasa I de la parte inferior de la tapa y remuévalo suavemente para mezclar; no agite mediante el vórtex. Añada 25 µl de colorante azul a la ADNasa I reconstituida como ayuda visual para el pipeteado y la preparación de los cartuchos. Cada purificación requiere 10 µl de solución de ADNasa I preparada. Almacene la ADNasa I reconstituida a una temperatura de entre –30 °C y –10 °C. No congele y descongele la ADNasa I reconstituida más de diez veces.



Precaución: Abra el vial de ADNasa I con cuidado, los bordes del vial podrían estar afilados.

6. Purificación de ARN de sangre completa fresca en tubos de EDTA

Mantenga un entorno sin ARNasa durante el procesamiento. Utilice siempre puntas de pipeta resistentes a aerosoles y sin ARNasa. Cambie de guantes con frecuencia para reducir las posibilidades de contaminación por ARNasa. Consulte la sección 12 (Creación de un entorno sin ribonucleasa) para obtener más detalles.

Materiales que ha de aportar el usuario

- Sangre completa en tubos de EDTA (no congelada); la sangre puede almacenarse hasta 3 días entre 2–10 °C antes de la purificación
- Microcentrífuga
- Pipetas serológicas de 10 ml (estériles)
- Pipeteadores y puntas de pipeta sin ARNasa, estériles y resistentes a aerosoles
- Tubos de 15 ml (estériles)
- Centrífuga con rotor flotante

6.A. Preprocesamiento de muestras de sangre completa

1. Transfiera 2,5 ml de sangre completa bien mezclada (no congelada) del tubo de EDTA a un tubo estéril de 15 ml.
2. Añada 7,5 ml de solución A e invierta el tubo 5–10 veces para mezclar. En este paso tiene lugar una lisis diferencial: los eritrocitos se lisan, mientras que los leucocitos permanecen intactos.
3. Incube los lisados a temperatura ambiente durante 10 minutos. Durante la incubación, invierta las muestras dos veces como se indica en el paso 2 para mezclar.
4. Centrifugue los tubos a $3000 \times g$ en un rotor flotante durante 10 minutos.
5. Elimine el sobrenadante por decantación o pipeteado. Gire brevemente el tubo para recoger el líquido residual que quede en el fondo. Con una pipeta, extraiga y deseche todo el sobrenadante restante que pueda sin afectar al sedimento de leucocitos visible.
6. Añada 200 μ l de 1-tioglicerol/solución B enfriada al sedimento y mezcle mediante el vórtex para volver a suspender el sedimento.
7. Añada 200 μ l de tampón lítico y 25 μ l de proteinasa K al sedimento que se ha vuelto a suspender. Mezcle mediante el vórtex durante 15–20 segundos.

Nota: Si necesita parar durante el preprocesamiento, las muestras pueden almacenarse después del paso 7 a una temperatura entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta 5 días. A estas temperaturas de almacenamiento, las muestras podrían congelarse o no congelarse por completo. Cuando esté listo para reanudar la purificación de las muestras, descongele los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de continuar con el siguiente paso.

8. Incube las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos. Mientras tanto, prepare los cartuchos como se describe en la sección 6.B.
9. Añada el lisado al pocillo n.º 1 del Maxwell® CSC RNA Blood Cartridge (el pocillo de mayor tamaño del cartucho).

6.B. Preparación del Maxwell® CSC RNA Blood Cartridge

1. Cambie de guantes antes de manipular Maxwell® CSC RNA Blood Cartridges, los émbolos CSC/RSC o los tubos de elución. Los cartuchos se colocan en las bandejas de plataforma fuera del instrumento y, a continuación, las bandejas de plataforma que contienen los cartuchos y las muestras se transfieren al instrumento para la purificación. Coloque cada cartucho en la bandeja de plataforma con el pocillo n.º 1 (el pocillo de mayor tamaño del cartucho) lo más lejos posible de los tubos de elución (figura 2). Presione hacia abajo el cartucho para encajarlo en su sitio. Asegúrese de que los dos extremos del cartucho estén totalmente asentados en la bandeja de plataforma. 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 del cartucho.



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

2. Coloque un émbolo CSC/RSC en el pocillo n.º 8 de cada cartucho.
3. Coloque un tubo de elución vacío en la posición de tubo de elución de cada cartucho en las bandejas de plataforma.

Nota: Utilice únicamente los tubos de elución suministrados en el Maxwell® CSC RNA Blood Kit. Otros tubos de elución pueden no ser compatibles con los Maxwell® CSC Instruments y afectar al rendimiento de purificación del ARN.

4. Añada 50 µl de Nuclease-Free Water en el fondo de cada tubo de elución. Los tubos de elución deben permanecer abiertos durante la purificación del ARN.

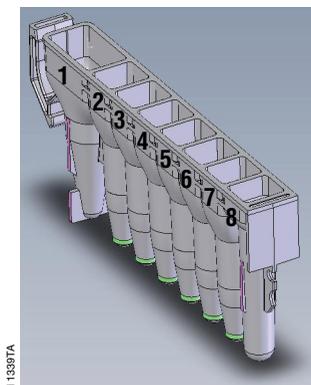
Nota: Utilice únicamente el Nuclease-Free Water suministrado en el Maxwell® CSC RNA Blood Kit. El empleo de otros tampones de elución puede afectar al rendimiento de purificación del ARN o a su uso posterior.

5. Añada 10 µl de ADNasa I reconstituida (azul) al pocillo n.º 4 (amarillo) de cada cartucho. El color verde resultante es un indicador visual de que se ha añadido la solución de ADNasa I al pocillo n.º 4.

Notas sobre la preparación del Maxwell® CSC RNA Blood Cartridge



Los derramamientos 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 utilice lejía en ninguna parte del instrumento.



Contenido de los pocillos añadido por el usuario:

1. Lisado preprocesado de las muestras
4. 10 µl de ADNasa I preparada
8. Émbolo CSC/RSC

Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge. Se añade lo siguiente a los pocillos: el lisado preprocesado de muestras de sangre, al pocillo n.º 1; 10 µl de ADNasa I, al pocillo n.º 4, y un émbolo CSC/RSC, al pocillo n.º 8.



Figura 2. Preparación y configuración de la bandeja de plataforma. Se añade Nuclease-Free Water (50 µl) a los tubos de elución de la manera indicada.

7. Ejecución del instrumento

El Maxwell® CSC RNA Blood Method para el Maxwell® CSC Instrument puede descargarse del sitio web de Promega: www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod. El Maxwell® CSC RNA Blood Method para el Maxwell® CSC 48 Instrument puede descargarse del sitio web de Promega: www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-csc-48-methods/

Si sospecha que su instrumento pueda estar contaminado con ARNasa, antes de utilizarlo límpielo con una solución de detergente, como Steris LpH®. Siga las instrucciones de la sección Limpieza y mantenimiento del manual de uso del Maxwell® CSC Instrument apropiado.

1. Encienda el Maxwell® Instrument y el Tablet PC. Inicie sesión en el Tablet PC e inicie el software de Maxwell® en modo IVD tocando dos veces el icono 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 RNA Blood Kit y toque **Aceptar** para seleccionar automáticamente el método para ejecutar (figura 3).

Nota: El código de barras del método que figura en la etiqueta del Maxwell® CSC RNA Blood Kit se necesita para la purificación de ARN en el Maxwell® CSC Instrument. La etiqueta del kit contiene dos códigos de barras. El código de barras del método se indica en la figura 3. Si no puede escanearse el código de barras, póngase en contacto con Promega Technical Services.



Figura 3. Etiqueta del kit que indica el código de barras que debe escanearse. Escanee el código de barras mostrado en el recuadro rojo de la parte superior derecha de la etiqueta del kit para ejecutar una purificación.

4. En la pantalla “Configuración de cartucho”, toque 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 pulse el botón **Continuar** para seguir.

Nota: Al usar el Maxwell® CSC 48 Instrument, presione el botón **Parte frontal** o **Parte trasera** para seleccionar las posiciones de los cartuchos en cada bandeja de plataforma o anular su selección.

- Una vez abierta la puerta, confirme que se hayan realizado todos los elementos de la lista de comprobación de extracción. Verifique que las muestras preprocesadas se hayan añadido al pocillo n.º 1 de los cartuchos, que los cartuchos estén cargados en el instrumento, que los tubos de elución sin tapar estén presentes con tampón de elución y que los émbolos estén en el pocillo n.º 8. Transfiera las bandejas de plataforma que contengan los cartuchos preparados a la plataforma del Maxwell® Instrument.

Introducción de la bandeja 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 esté colocada 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.

- Confirme que se ha realizado todo el preprocesamiento indicado y toque **Iniciar** para cerrar la puerta del instrumento e iniciar el procesamiento.

Nota: Al utilizar un Maxwell® Instrument de 48 posiciones, si se ha activado el sistema de visión, las bandejas de plataforma se escanearán mientras se retrae la puerta. Cualquier error en la configuración de las bandejas de plataforma (por ejemplo, los émbolos no están en el pocillo n.º 8 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. Toque el signo de exclamación para ver una descripción del error y resolver todos los estados de error. Vuelva a tocar el botón **Iniciar** para repetir el escaneo de las bandejas de plataforma y comenzar la ejecución de extracción.



Advertencia: Peligro de aprisionamiento.

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

Notas:

- Al tocar el botón **Cancelar**, se abandonará la ejecución. Se perderán todas las muestras de una ejecución cancelada.
 - 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. Si hay émbolos presentes en la barra de émbolo, debe ejecutar **Limpiar** cuando se le pida. Si no hay émbolos presentes en la barra de émbolo, puede elegir omitir **Limpiar** cuando se le pida. Se perderán las muestras.
- Cuando haya terminado la ejecución, la interfaz de usuario mostrará un mensaje que indica que el método ha finalizado.

7. Ejecución del instrumento (continuación)

Fin de la ejecución

- 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 8 del cartucho al final de la ejecución. Si no se han retirado los émbolos de la barra de émbolo, siga las instrucciones del Manual de uso de su Maxwell® Instrument (consulte la tabla 1) para ejecutar el proceso **Limpiar** para intentar descargar los émbolos.
- Tape y retire los tubos de elución que contienen ARN inmediatamente después de la ejecución para evitar que los eluatos se evaporen. Retire las bandejas de plataforma Maxwell® del instrumento.

Nota: Para extraer la bandeja de plataforma del instrumento, sujétela por los laterales. Las muestras de ARN pueden almacenarse durante una noche a una temperatura entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, o bien a menos de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un almacenamiento más prolongado.

Asegúrese de que las muestras se retiren del instrumento antes de ejecutar un protocolo de desinfección por UV para evitar daños en el ácido nucleico purificado.



- Retire los cartuchos y los émbolos de las bandejas de plataforma Maxwell® y deséchelos como residuos peligrosos siguiendo los procedimientos institucionales. Los cartuchos, los émbolos y los tubos de elución están diseñados para un solo uso. No reutilice Maxwell® CSC Cartridges, los émbolos CSC/RSC ni los tubos de elución.

8. Después de la purificación

Compruebe que el rendimiento y la pureza de la muestra de ARN purificado cumplen los requisitos para el análisis de diagnóstico posterior antes de utilizarla en este análisis.

9. Evaluación del rendimiento analítico

El rendimiento analítico del Maxwell® CSC RNA Blood Kit se evaluó utilizando muestras de sangre completa humana en el Maxwell® CSC Instrument. Se demostró un rendimiento equivalente del Maxwell® CSC RNA Blood Kit con el Maxwell® CSC 48 Instrument como parte del desarrollo del instrumento.

9.A. Cantidad y calidad de ARN

Tabla 2. ARN extraído de especímenes replicados de sangre completa enviada. El ARN se extrajo de ocho especímenes duplicados de 2,5 ml de sangre completa enviada y se eluyó en 50 μ l. La absorbancia del ARN purificado se midió a 230 nm, 260 nm, 280 nm y 340 nm. La concentración de ARN se determinó utilizando la absorbancia a 260 nm después de restar la absorbancia del blanco y corregir el ruido del instrumento (absorbancia a 340 nm) y se calcularon las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} para evaluar la calidad del ARN. El Maxwell® CSC RNA Blood Kit produjo concentraciones de ARN promedio de 127,54 ng/ μ l con una relación A_{260}/A_{280} promedio de 2,12 y una relación A_{260}/A_{230} promedio de 2,10.

Reproducir exactamente	Concentración de ARN (ng/ μ l)	Tasa de A_{260}/A_{280}	Tasa de A_{260}/A_{230}
1	118,22	2,11	2,01*
2	137,85	2,12	2,08
3	107,23	2,12	2,09
4	133,07	2,12	2,09
5	137,18	2,12	2,11
6	93,90	2,12	2,09
7	145,42	2,13	2,12
8	147,45	2,13	2,12
Promedio	127,54	2,12	2,10

*La prueba de valores atípicos de Dixon permitió la exclusión de una réplica en este conjunto como un valor atípico en el umbral de confianza del 95 %. Esta réplica se excluyó del análisis.

9.B. Amplificabilidad de ARN

Tabla 3. Evaluación de la amplificabilidad del ARN de sangre completa. Para evaluar la capacidad de amplificación del ARN extraído de sangre completa con Maxwell® CSC RNA Blood Kit y Maxwell® CSC Instrument, cada muestra de ARN extraída se amplificó por duplicado con un ensayo RT-qPCR dirigido a un gen de mantenimiento, HPRT1 (hipoxantina fosforribosiltransferasa 1). Todas las muestras de ARN se amplificaron dentro del rango lineal del ensayo, con rendimientos que oscilaron entre 117,84–182,79 ng/μl y un rendimiento promedio en todas las muestras de 151,58 ng/μl.

Muestra de ARN	Concentración de ARN (ng/μl) determinada por RT-qPCR
1	144,70
2	136,90
3	117,84
4	151,06
5	173,55
6	124,25
7	182,79
8	181,55
Promedio	151,58

9.C. Reproducibilidad

Tabla 4. Variabilidad de usuario a usuario en la extracción de ARN de sangre completa. Para evaluar la variabilidad de un usuario a otro, tres usuarios diferentes extrajeron el ARN de muestras de sangre completa utilizando el Maxwell® CSC RNA Blood Kit y Maxwell® CSC Instrument. El ARN extraído se amplificó en un ensayo de RT-qPCR dirigido al gen HPRT1 y las concentraciones de ARN se calcularon a partir de los valores de C_q . Cada conjunto de muestras incluía ocho réplicas. El coeficiente de variación porcentual (% CV) en los tres conjuntos de muestras de usuarios fue de 9,83.

Usuario	Rendimiento medio (ng/μl)	% CV
1 (n = 7)*	134,44	3,24
2 (n = 7)*	134,42	4,64
3 (n = 8)	122,95	15,13
% CV, Usuarios 1, 2, 3		9,83

*La prueba de valores atípicos de Dixon permitió la exclusión de una réplica en este conjunto como un valor atípico en el umbral de confianza del 95 %. Esta réplica se excluyó del análisis.

9.D. Inhibición (sustancias interferentes)

Tabla 5. Pruebas de contaminación por ARNasa e inhibición de la amplificación del ARN debida a sustancias que interfieren. Se extrajo ARN de ocho muestras duplicadas del mismo espécimen de sangre completa utilizando el Maxwell® CSC RNA Blood Kit y Maxwell® CSC Instrument. Se usó un ensayo de detección de ARNasa comercialmente disponible para probar la presencia de ARNasa activa en los eluatos. No se observó actividad ARNasa detectable. También se evaluó el efecto de las sustancias de interferencia que se copurifican con el ARN de sangre completa. Se ensamblaron dos conjuntos de amplificaciones para cada eluato de ARN, uno con 2 µl de ARN sin diluir por RT-qPCR para el objetivo HPRT1 y un segundo conjunto con 2 µl de una dilución de ocho veces, y se calcularon los valores de ΔC_q . Los valores de ΔC_q oscilaron entre un mínimo de 2,256 ciclos y un máximo de 3,116 ciclos. Todos los valores de ΔC_q estuvieron en el rango de 3 ± 1 ciclos esperado para una dilución de ocho veces, lo que confirma que cualquier sustancia que se copurificara con ARN de sangre completa tuvo un efecto mínimo en la amplificación.

Número de muestra	C_q para ARN sin diluir (ciclos)	C_q para dilución óctuple de ARN (ciclos)	ΔC_q (ciclos)
1	25,528	27,881	2,353
2	23,530	26,647	3,116
3	23,836	26,888	3,052
4	23,602	26,618	3,016
5	24,139	26,407	2,268
6	23,567	25,824	2,256
7	23,694	26,469	2,774
8	24,298	27,189	2,891

9.E. Contaminación Cruzada

Se extrajo ARN de 8 réplicas de una única muestra de sangre completa y 8 controles negativos (agua) utilizando el Maxwell® CSC RNA Blood Kit y Maxwell® CSC Instrument. Los Maxwell® CSC cartridges que contenían muestras de sangre completa o control negativo (agua) se procesaron en posiciones alternas de plataforma en el Maxwell® CSC Instrument. Los eluatos de ARN resultantes se analizaron por duplicado mediante RT-qPCR dirigida a HPRT1 para detectar cualquier contaminación de ARN en los controles negativos de las muestras de sangre completa vecinas. Se detectó ARN no contaminante en los controles negativos.

10. Evaluación del rendimiento clínico

Un laboratorio clínico externo evaluó el rendimiento clínico del Maxwell® CSC RNA Blood Kit utilizando muestras de sangre completa humana y el Maxwell® CSC Instrument.

10.A. Cantidad, calidad y amplificabilidad del ARN

Tabla 6. Comparación de métodos. Se extrajo ARN de muestras de 2,5 ml de un total de 24 especímenes de sangre completa diferentes utilizando el Maxwell® CSC RNA Blood Kit y Maxwell® CSC Instrument. Se extrajo ARN de las mismas muestras utilizando el método de purificación de ácido nucleico estándar del laboratorio (método de referencia de laboratorio) con fines comparativos. El ARN extraído se probó en RT-qPCR para BCR-ABL1 dirigido a la transcripción de ABL1 de tipo salvaje (protooncogén 1 de ABL) de acuerdo con los procedimientos estándar del laboratorio clínico y el rendimiento se determinó como el número de copias de ABL1 detectadas. Los eluatos de ARN de la misma muestra de sangre completa se analizaron en el mismo ensayo de RT-qPCR para minimizar los efectos de la variabilidad del ensayo en los resultados. El ARN extraído con el Maxwell® CSC RNA Blood Kit produjo $\geq 10\ 000$ copias de ABL1 en el ensayo RT-qPCR. Los rendimientos obtenidos con el ARN extraído de la misma muestra de sangre fueron concordantes para el ARN extraído con el Maxwell® CSC RNA Blood Kit y el método de referencia de laboratorio.

Muestra de sangre	Rendimiento de ARN (copias ABL1)		Promedio de C_q		ΔC_q (Maxwell® CSC– Método de referencia de laboratorio)
	Sistema Maxwell® CSC	Método de referencia del laboratorio	Sistema Maxwell® CSC	Método de referencia del laboratorio	
1	69 083,3	40 833,2	22,06	22,86	-0,80
2	223 597,5	80 162,6	20,29	21,84	-1,55
3	124 624,0	45 716,7	21,17	22,69	-1,52
4	108 277,1	46 241,3	21,39	22,71	-1,32
5	121 341,0	64 340,2	21,21	22,17	-0,96
6	83 351,0	52 905,5	21,78	22,46	-0,68
7	143 918,0	61 427,5	20,95	22,24	-1,29
8	118 185,0	50 284,7	21,25	22,54	-1,29
9	58 022,8	40 434,3	22,76	23,30	-0,54
10	101 240,1	45 860,7	21,94	23,11	-1,17
11	59 266,0	44 276,5	22,74	23,16	-0,42
12	71 620,9	50 254,9	22,45	22,98	-0,53
13	92 923,4	60 768,8	22,07	22,69	-0,62
14	62 285,3	47 983,2	22,66	23,04	-0,38
15	81 094,3	50 554,7	22,27	22,97	-0,70
16	88 203,5	56 790,2	22,14	22,79	-0,65
17	35 307,2	29 342,7	22,85	23,11	-0,26
18	30 544,4	30 890,3	23,08	23,04	0,04
19	35 016,3	37 702,2	22,86	22,74	0,12
20	26 850,8	29 618,1	23,25	23,10	0,16
21	26 792,4	34 277,7	23,25	22,88	0,37
22	35 179,1	30 662,9	22,84	23,05	-0,20
23	47 123,3	40 675,5	22,41	22,63	-0,22
24	50 146,0	30 248,6	22,31	23,07	-0,75

10.B. Reproducibilidad

Tabla 7. Reproducibilidad de la extracción de ARN por diferentes probadores. Para confirmar la consistencia de los resultados entre los usuarios en el entorno de usuario típico, se extrajo el ARN de ocho muestras de sangre completa diferentes mediante dos probadores independientes utilizando el Maxwell® CSC RNA Blood Kit y Maxwell® CSC Instrument. Los eluatos de ARN resultantes se amplificaron mediante un ensayo de RT-qPCR para BCR-ABL1 dirigido al transcrito de ABL1 de tipo salvaje y los resultados obtenidos de cada muestra se compararon entre los dos evaluadores. El ARN extraído por ambos probadores de todos los especímenes fue amplificable y produjo $\geq 10\,000$ copias de ABL1, con una diferencia promedio de C_q (ΔC_q) entre los probadores de menos de 1 ciclo. El ΔC_q osciló entre 0,03 y 1,25.

Muestra de sangre	Rendimiento de ARN (copias ABL1)		Promedio de C_q		ΔC_q Entre Probadores
	Probador 1	Probador 2	Probador 1	Probador 2	
1	69 083,3	68 042,8	22,06	22,09	0,03
2	223 597,5	102 244,2	20,29	21,47	1,18
3	124 624,0	68 351,6	21,17	22,08	0,91
4	108 277,1	48 271,9	21,39	22,60	1,21
5	121 341,0	133 669,5	21,21	21,53	0,32
6	83 351,0	64 549,4	21,78	22,60	0,82
7	143 918,0	84 824,5	20,95	22,20	1,25
8	118 185,0	83 599,3	21,25	22,22	0,97

10.C. Contaminación Cruzada

Se evaluó la contaminación cruzada que se produce entre las muestras durante la extracción de ARN utilizando el Maxwell® CSC RNA Blood Kit en el entorno típico del usuario. La extracción de ARN con el Maxwell® CSC RNA Blood Kit se realizó con ocho muestras de sangre completa diferentes y ocho controles negativos (agua) en la misma serie de instrumentos. Los Maxwell® CSC cartridges que contenían muestras de sangre completa o controles negativos se procesaron en posiciones de plataforma adyacentes alternas en Maxwell® CSC Instrument. Los eluatos resultantes se analizaron por duplicado mediante RT-qPCR dirigida al gen ABL1 de tipo salvaje para determinar si las muestras de control negativo contenían algún ARN contaminante de las muestras de sangre. No se detectó ARN contaminante en los controles negativos, lo que confirma que no hubo contaminación cruzada detectable durante la extracción de ARN utilizando el sistema Maxwell® CSC.

11. 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 ver la información de contacto en: www.promega.com.

Correo electrónico: techserv@promega.com

Síntomas

Concentración de ARN en el eluato menor de lo esperado (una muestra típica debe dar como resultado >50 ng/μl de ARN purificado).

Causas posibles y comentarios

El recuento leucocitario de la muestra de sangre estaba por debajo o por encima del rango de uso previsto del producto de entre 4×10^6 y 10×10^6 leucocitos/ml. El kit está optimizado para purificar ARN de muestras de sangre con un recuento leucocitario de entre 4×10^6 y 10×10^6 leucocitos/ml.

Se ha empleado un volumen incorrecto de sangre completa. Añadir una cantidad mayor o menor que 2,5 ml de sangre completa puede provocar un rendimiento inferior.

La muestra de sangre era demasiado antigua. Se obtienen mejores rendimientos con muestras de sangre recientes. Las muestras almacenadas entre 2–10 °C durante más de 3 días pueden provocar un rendimiento reducido.

La muestra se ha almacenado a una temperatura inferior a 2 °C o superior a 10 °C antes de la purificación. Las temperaturas de almacenamiento inadecuadas pueden provocar lisis de leucocitos o degradación del ARN.

Pueden haberse introducido RNAsas durante el procesamiento o la cuantificación de las muestras. Consulte la sección 12 para obtener información sobre la creación de un entorno sin ribonucleasa.

Eliminación del sobrenadante inadecuada después de lisis diferencial. Asegúrese de que la eliminación del sobrenadante sea lo más completa posible.

El sedimento de leucocitos se ha desplazado durante la eliminación del sobrenadante. Evite tocar el sedimento de leucocitos al eliminar el sobrenadante.

Tipo de muestra incorrecto. El kit está diseñado para utilizarse con sangre completa humana. Otros tipos de muestras (por ejemplo, médula ósea, plasma o capa leucocitaria) no se han probado con este kit.

Tipo de tubo de muestras sanguíneas incorrecto. El kit está diseñado para utilizarse con sangre completa humana en tubos de EDTA. Otros tipos de tubos no se han probado con este kit y puede que no sean compatibles con los productos químicos de la purificación.

Síntomas

Baja calidad del ARN
(los eluatos deben tener una proporción de A_{260}/A_{280} mayor que 1,8 y una proporción de A_{260}/A_{230} entre 1,8 y 2,4).

Causas posibles y comentarios

El recuento leucocitario de la muestra de sangre estaba por encima del rango de uso previsto del producto de entre 4×10^6 y 10×10^6 leucocitos/ml. El kit está optimizado para purificar ARN de muestras de sangre con un recuento leucocitario de entre 4×10^6 y 10×10^6 leucocitos/ml.

Se ha empleado un volumen incorrecto de sangre completa. Añadir una cantidad mayor que 2,5 ml de sangre completa puede provocar una baja pureza del eluato.

La muestra de sangre era demasiado antigua. Se obtienen mejores rendimientos con muestras de sangre recientes. Las muestras almacenadas entre 2 °C–10 °C durante más de 3 días pueden provocar una calidad del ARN reducida.

La muestra se ha almacenado a una temperatura inferior a 2 °C o superior a 10 °C antes de la purificación. Las temperaturas de almacenamiento inadecuadas pueden provocar lisis de leucocitos o degradación del ARN.

Eliminación del sobrenadante inadecuada después de lisis diferencial. Asegúrese de que la eliminación del sobrenadante sea lo más completa posible.

Tipo de muestra incorrecto. El producto está diseñado para utilizarse con sangre completa humana. Otros tipos de muestras (por ejemplo, médula ósea, plasma o capa leucocitaria) no se han probado con este producto.

Los eluatos contienen altos niveles de ADN
(los eluatos están contaminados con ADN, lo que puede afectar a los análisis posteriores).

El recuento leucocitario de la muestra de sangre está por encima del rango de uso previsto del producto de entre 4×10^6 y 10×10^6 leucocitos/ml.

Se ha empleado un volumen incorrecto de sangre completa. Añadir una cantidad mayor que 2,5 ml de sangre completa puede provocar la contaminación de los eluatos con ADN.

No se ha añadido ADNasa I al cartucho. Si es posible, examine el pocillo n.º 4 de los cartuchos utilizados. El pocillo n.º 4 deberá mostrar un color verde (no amarillo) si se ha añadido ADNasa I a los cartuchos en la sección 6.B, paso 5.

11. Solución de problemas (continuación)

Síntomas

El lisado preprocesado es demasiado viscoso para pipetearse.

Causas posibles y comentarios

El recuento leucocitario de la muestra de sangre estaba por encima del rango de uso previsto del producto de entre 4×10^6 y 10×10^6 leucocitos/ml.

Se ha empleado un volumen incorrecto de sangre completa. Añadir una cantidad mayor que 2,5 ml de sangre completa puede provocar que los lisados sean viscosos y sea difícil pipetearlos.

Se deberá comunicar de inmediato al fabricante todo suceso grave que se produjera en relación con el producto y que provocara (o pudiera provocar) la muerte o una lesión grave a un usuario o paciente. Los usuarios residentes en la Unión Europea también deberán notificar todo suceso grave a la autoridad competente del Estado miembro en el que resida el usuario y/o el paciente.

12. Creación de un entorno sin ribonucleasa

Las ribonucleasas son extremadamente difíciles de desactivar. Procure evitar que se produzca actividad de ARNasa en sus muestras de ARN durante y después del aislamiento. Esto es especialmente importante si el material de inicio fue difícil de obtener o es irremplazable. Las siguientes indicaciones le ayudarán a evitar la contaminación accidental de sus muestras con ARNasa.

1. Dos de las fuentes más comunes de contaminación con ARNasa son las manos del usuario y las bacterias u hongos que puede haber en las partículas de polvo en suspensión. Para evitar la contaminación con estas fuentes, utilice una técnica que garantice la esterilidad cuando deba manipular los reactivos suministrados con este sistema. Utilice guantes en todo momento. Cambie de guantes siempre que pueda haber entrado en contacto con ribonucleasas.
2. Siempre que sea posible, deben utilizarse instrumentos de plástico estériles y desechables para manejar el ARN. Estos materiales suelen carecer de ARNasa y no necesitan pretratamiento para desactivarla.
3. Trate los instrumentos de vidrio y de plástico y las cámaras de electroforesis no estériles antes de utilizarlos para asegurarse de que carezcan de ARNasa. Caliente los instrumentos de vidrio en el horno a 200 °C durante toda la noche y enjuague a fondo los instrumentos de plástico con 0,1 N de NaOH y 1 mM de EDTA, seguido de agua sin ARNasa. También pueden emplearse productos de eliminación de ARNasa convencionales, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Nota: Las cámaras de electroforesis pueden estar contaminadas con ribonucleasas, concretamente con ARNasa A, del análisis de muestras de ADN. Siempre que sea posible, aparte los aparatos nuevos o descontaminados para utilizarlos únicamente para el análisis del ARN.

4. Trate las soluciones no suministradas con el sistema añadiendo pirocarbonato de dietilo (DEPC) al 0,1 % v/v en una campana extractora. Incúbelas durante toda la noche a temperatura ambiente en la campana extractora, removiendo cada cierto tiempo. Trátelas en la autoclave durante 30 minutos para eliminar cualquier resto de DEPC.



Precaución: El DEPC es un posible carcinógeno, por lo que solo debería utilizarse en una campana extractora para productos químicos. El DEPC reacciona rápidamente con las aminas y no puede utilizarse para tratar tampones de Tris.

Nota: Para todas las aplicaciones posteriores, es crucial que siga protegiendo sus muestras de ARN de las RNasas. Utilice guantes limpios y emplee soluciones sin ARNasa y tubos de centrífuga.

13. Bibliografía

1. Clinical Laboratory Standards Institute (2007). Handling, transport, and storage of specimens for molecular methods. Puede visualizarse en línea en: **www.clsi.org**
2. Murray, P.R. *et al.* (2007) *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition, ASM Press.

14. Productos relacionados

Instrumentos y accesorios

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
Microtube, 1,5 ml	1000/paquete	V1231

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

Maxwell® CSC Reagent Kits

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

15. Resumen de las modificaciones

Se han realizado las siguientes modificaciones a la revisión 10/22 de este documento:

1. Se ha cambiado el nombre de la sección 3 a “Finalidad del producto/uso previsto”.
2. Se han añadido las secciones 9 y 10 y se han reenumerado las secciones posteriores.
3. Se ha actualizado el documento de conformidad con el Reglamento (UE) 2017/746 en productos sanitarios para diagnóstico in vitro.

^(a)Número de patente de EE. UU. 7 329 488 y número de patente de Corea del Sur 100483684.

© 2014–2022 Promega Corporation. Todos los derechos reservados.

Maxwell es una marca registrada de Promega Corporation.

LpH es una marca registrada de Steris Corporation.

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.