

MANUAL TÉCNICO

Maxwell[®] CSC RNA FFPE Kit

Instrucciones de uso del producto
AS1360

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

Maxwell[®] CSC RNA FFPE 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	6
5.A. Preparación de muestras FFPE	6
5.B. Preparación del Maxwell [®] CSC RNA FFPE Cartridge	8
6. Ejecución del instrumento	10
7. Después de la purificación	12
8. Evaluación del rendimiento analítico	13
8.A. Cantidad, calidad y amplificabilidad del ARN.....	13
8.B. Reproducibilidad.....	14
8.C. Sustancias de interferencias (inhibición)	14
8.D. Contaminación cruzada.....	15
9. Evaluación del rendimiento clínico	15
9.A. Cantidad, calidad y amplificabilidad del ARN.....	15
9.B. Reproducibilidad.....	16
9.C. Contaminación cruzada.....	16
10. Solución de problemas	17
11. Creación de un entorno sin ribonucleasa.....	19
12. Bibliografía	19
13. Productos relacionados	20
14. Resumen de las modificaciones	20

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

1. Descripción

El Maxwell® CSC RNA FFPE Kit^(a) se utiliza junto con los Maxwell® CSC Instruments especificados en la tabla 1 para proporcionar un método sencillo para una purificación eficaz y automatizada de ARN a partir de muestras de tejido FFPE (fijado mediante formalina e incrustado en parafina) de mama, pulmón o colon humanos. Los Maxwell® CSC Instruments se han diseñado para usarse con los cartuchos de reactivos predispensados y los 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 45 minutos, y el ARN purificado puede usarse directamente en diversas aplicaciones posteriores basadas en amplificación como, por ejemplo, RT-PCR.

Tabla 1. Instrumentos compatibles

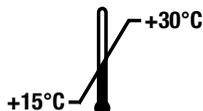
Instrumento	Cat.#	Manual técnico
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Principio del método: El Maxwell® CSC RNA FFPE Kit purifica el ácido nucleico 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 son instrumentos que manejan las partículas usando métodos magnéticos. Este sistema permite que el ARN se adhiera eficazmente a las partículas paramagnéticas del primer pocillo de un cartucho prellenado y mueve la muestra por los pocillos del cartucho. Este enfoque de captura magnética evita los problemas frecuentes 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 automatizados de uso frecuente.

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

PRODUCTO	TAMAÑO	CAT.#
Maxwell® CSC RNA FFPE Kit	48 preps	AS1360

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



Incluye:

- 25 ml aceite mineral
- 20 ml tampón para lisis
- 2 × 1 ml proteinasa K
- 100 µl colorante azul
- 2 × 1 ml MnCl₂, 0,09 M
- 1 ml tampón de ADNasa
- 3 viales ADNasa I (liofilizada)
- 48 Maxwell® FFPE Cartridges
- 50 émbolos CSC/RSC
- 50 tubos de elución (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

Condiciones de almacenamiento: Almacene el Maxwell® CSC RNA FFPE Kit a temperatura ambiente (entre +15 °C y +30 °C). Almacene la ADNasa I rehidratada entre -30 °C y -10 °C. No la congele y descongele más de 10 veces.



Información de seguridad: Los cartuchos contienen etanol e isopropanol. Estas sustancias deben considerarse inflamables, dañinas e irritantes.



Los componentes del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit están diseñados para su uso con sustancias potencialmente infecciosas. Lleve un equipo de protección personal adecuado (por ejemplo, guantes y gafas de seguridad) cuando manipule sustancias infecciosas. Siga las directrices institucionales de manejo y eliminación de todas las sustancias infecciosas utilizadas en el sistema.

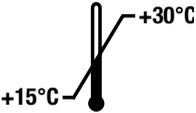


Precaución: Manipule los cartuchos con cuidado, los bordes del sistema de sellado podrían estar afilados.

Información adicional: Los componentes del Maxwell® CSC RNA FFPE 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.

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

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 aprisionamiento.		Número de catálogo
	Número de lote		No reutilizar

3. Finalidad del producto/uso previsto

El Maxwell® CSC RNA FFPE Kit está diseñado para usarse, junto con los Maxwell® CSC Instruments y el método de purificación Maxwell® CSC RNA FFPE, como dispositivo médico para diagnóstico in vitro (IVD, por sus siglas en inglés) para realizar un aislamiento automatizado del ARN a partir de muestras de tejido FFPE (fijado mediante formalina e incrustado en parafina) de mama, pulmón o colon humanos. El ARN purificado es adecuado para el uso en ensayos de diagnóstico in vitro basados en amplificación.

El Maxwell® CSC RNA FFPE 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.

Con el Maxwell® CSC RNA FFPE Kit pueden usarse muestras FFPE preparadas mediante formalina tamponada neutra al 10 %.

El Maxwell® CSC RNA FFPE 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 rendimiento del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit se evaluó mediante el uso de muestras de tejido FFPE tomadas de mama, pulmón y colon humanos. No está diseñado para usarse con muestras de tejido no FFPE, por ejemplo, muestras de tejido frescas o congeladas. El Maxwell® CSC RNA FFPE Kit no está diseñado para su uso con otros tipos de muestras, incluidas las muestras no humanas, ni para la purificación de ADN.

El Maxwell® CSC RNA FFPE Kit no se ha diseñado para usarse con muestras de tejido preparadas con fijadores distintos a la formalina tamponada neutra al 10 %.

Se ha evaluado el rendimiento del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit mediante el aislamiento del ARN de muestras de tejido FFPE de tamaños comprendidos entre 0,1 mm–2,0 mm³.

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 FFPE Kit.

5. Antes de empezar

Materiales que ha de aportar el usuario

- Microcentrífuga
- Pipeteadores y puntas de pipeta para preprocesar y transferir muestras a cartuchos de reactivos prellenados
- Tubos de 1,5–2,0 ml para incubar las muestras (por ejemplo, Microtubes, 1,5 ml; Cat.# V1231)
- Bloques calefactados ajustados a 56 °C y 80 °C
- Muestras FFPE con un volumen de tejido total de entre 0,1–2,0 mm³; el grosor de la sección no debe superar los 5 µm. (**Nota:** Las muestras deben almacenarse a temperatura ambiente [15–30 °C]).
- Cuchillas (**Nota:** Tenga cuidado al utilizar las cuchillas para raspar la muestra de la barra corredera).



Si es necesario, reconstituya un vial liofilizado de ADNasa I con 275 µl de Nuclease-Free Water. Invierta el vial para enjuagar la ADNasa I de la parte inferior de la tapa y remuévalo suavemente para mezclar; no agite mediante el vórtex.

5.A. Preparación de muestras FFPE

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 11 (Creación de un entorno sin ribonucleasa) para obtener más detalles.

Preprocesamiento de muestras de sección

1. Coloque la sección en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Si utiliza secciones de tejido montadas en una barra corredera, raspe la sección con una cuchilla limpia para retirarla de la barra corredera.
2. Añada 300 µl de aceite mineral a los tubos de muestras. Mezcle mediante el vórtex durante 10 segundos.
3. Caliente las muestras a 80 °C durante 2 minutos. Deje las muestras a temperatura ambiente mientras prepara la mezcla maestra.
4. Prepare una mezcla maestra de tampón para lisis, proteinasa K y colorante azul como se muestra a continuación:

Reactivo	Cantidad/reacción	Reacciones	
		(número de ejecuciones + 1)	Total
Tampón para lisis	224 µl	n + 1	224 µl × (n + 1)
Proteinasa K	25 µl	n + 1	25 µl × (n + 1)
Colorante azul	1 µl	n + 1	1 µl × (n + 1)

5. Añada 250 µl de mezcla maestra a cada tubo de muestras y mezcle mediante el vórtex durante 5 segundos.
6. Centrifugue los tubos de muestras a 10 000 × g durante 20 segundos para separar las capas. Si hay un sedimento en la capa acuosa (capa inferior, de color azul), mézclela suavemente para dispersar el sedimento. Deje las dos fases en el tubo.
7. Transfiera los tubos de muestras al bloque calefactado a 56 °C e incúbelos durante 15 minutos.

8. Transfiera los tubos de muestras al bloque calefactado a 80 °C e incúbelos durante 1 hora.
9. Extraiga los tubos de muestras del bloque calefactado y deje enfriar las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos. Mientras se enfrían las muestras, prepare la mezcla de ADNasa como se describe en el paso 10.
10. Prepare una mezcla de MnCl₂, tampón de ADNasa y ADNasa I en el orden siguiente:

Reactivo¹	Cantidad/reacción	Reacciones (número de ejecuciones + 1)	Total
MnCl ₂ , 0,09 M	26 µl	n + 1	26 µl × (n + 1)
Tampón de ADNasa ²	14 µl	n + 1	14 µl × (n + 1)
ADNasa I ³	10 µl	n + 1	10 µl × (n + 1)

¹ Si los reactivos de la mezcla de ADNasa se añaden a los tubos de muestra de uno en uno, asegúrese de añadirlos en el orden indicado anteriormente. Incorpore cada reactivo pipeteándolo por completo antes de añadir el siguiente reactivo.

² Almacene el tampón de ADNasa a 15–30 °C; puede precipitarse si se almacena a temperaturas inferiores. Si el tampón contiene un precipitado, vuelva a solubilizarlo calentándolo a 56 °C durante 2 minutos y agitándolo brevemente mediante el vórtex para que se mezcle.

³ Almacene la ADNasa I reconstituida restante a entre –30 °C y –10 °C.

11. Añada 50 µl de mezcla de ADNasa a la fase acuosa azul de cada tubo de muestras. Mezcle mediante pipeteado 10 veces.
12. Incube los tubos de muestras a temperatura ambiente (15–30 °C) durante 15 minutos. Durante esta incubación, prepare los cartuchos como se describe en la sección 5.B.
13. Centrifugue los tubos de muestras a velocidad máxima en una microcentrífuga durante 5 minutos.
14. Transfiera inmediatamente la fase acuosa azul al pocillo n.º 1 de un Maxwell[®] CSC RNA FFPE Cartridge.

5.B. Preparación del Maxwell® CSC RNA FFPE Cartridge

1. Cambie de guantes antes de manipular Maxwell® FFPE Cartridges, los émbolos CSC/RSC o los tubos de elución. Los cartuchos se colocan en las bandejas de plataforma fuera del instrumento, y 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 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 FFPE Kit. Otros tubos de elución pueden no ser compatibles con el Maxwell® CSC Instrument y afectar al rendimiento de purificación de ARN.

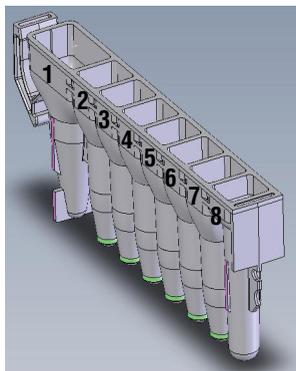
4. Añada 50 µl de Nuclease-Free Water en el fondo de cada tubo de elución. Los tubos de elución deben permanecer abiertos durante la purificación del ARN.

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

Notas sobre la preparación del Maxwell® CSC RNA FFPE Cartridge



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 utilice lejía en ninguna parte del instrumento.



Contenido de los pocillos añadido por el usuario:

1. Muestras preprocesadas
8. Émbolo CSC/RSC

Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge. Se añade lo siguiente a los pocillos: la muestra FFPE preprocesada al pocillo n.º 1, y un émbolo al pocillo n.º 8.



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

6. Ejecución del instrumento

El Maxwell® CSC RNA FFPE Method para el Maxwell® CSC Instrument puede descargarse del sitio web de Promega: www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod. El Maxwell® CSC RNA FFPE Method para el Maxwell® CSC 48 Instrument puede descargarse del sitio web de Promega: www.promega.com/resources/tools/maxwellcsc48method

Si sospecha que su instrumento puede 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 (#TM457)* o el *Manual de uso del Maxwell® CSC 48 Instrument (#TM623)*.

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 FFPE Kit y pulse **Aceptar** para seleccionar automáticamente el método para ejecutar (figura 3).

Nota: El código de barras del método del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit se requiere para la purificación de ARN 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 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.

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 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 la bandeja de plataforma que contenga 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 delantera 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. Confirme que se ha realizado todo el preprocesamiento indicado y pulse **Iniciar** para cerrar la puerta del instrumento e iniciar el procesamiento.

Nota: Al usar 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.

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

Notas:

1. Al tocar el botón **Cancelar**, se abandonará la ejecución. Se perderán todas las muestras de una ejecución cancelada.
2. 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.

8. Cuando haya terminado la ejecución, la interfaz de usuario mostrará un mensaje indicando que el método ha finalizado.



6. Ejecución del instrumento (continuación)

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 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.
10. 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. Asegúrese de que las muestras se retiren del instrumento antes de ejecutar un protocolo de desinfección por UV para evitar daños al ácido nucleico purificado. Las muestras de ARN pueden almacenarse durante una noche a entre -30 y -10 °C, o bien a menos de -60 °C para un almacenamiento más prolongado.



11. 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 son de un solo uso. No reutilice Maxwell® CSC Cartridges, CSC/RSC Plungers ni Elution Tubes.



7. Después de la purificación

Compruebe que el rendimiento y la pureza de la muestra de ARN purificado cumplan los requisitos de entrada para el ensayo de diagnóstico posterior antes de usarla en ese análisis. Se ha evaluado el rendimiento del kit en función de la purificación del ARN amplificable. Otros medios de cuantificación, incluidas la absorbancia y la fijación de colorante fluorescente, pueden no ser compatibles con la amplificación (1). Las lecturas de absorbancia de las muestras FFPE pueden sobrestimar el rendimiento; se recomienda utilizar métodos más específicos para determinarlo (1).

8. Evaluación del rendimiento analítico

El rendimiento analítico del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit se evaluó mediante el uso de muestras de tejido FFPE de mama, colon y pulmón humanos en el Maxwell® CSC Instrument. Además, el Maxwell® CSC RNA FFPE Kit se evaluó con el Maxwell® CSC 48 Instrument para demostrar el rendimiento equivalente del kit en ambos instrumentos.

8.A. Cantidad, calidad y amplificabilidad del ARN

Se evaluaron la cantidad, calidad y amplificabilidad del ARN para eluatos preparados a partir de secciones de muestras FFPE de mama, colon y pulmón, mediante el uso del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit y el Maxwell® CSC Instrument. Las muestras (2 μ l y 8 μ l) de cada eluato se evaluaron en un ensayo RT-qPCR dirigido a un gen de mantenimiento, HPRT1 (hipoxantina fosforribosiltransferasa 1). La entrada de los eluatos en el RT-qPCR de 2 μ l y 8 μ l se usó para evaluar la inhibición, debido a que una diferencia de entrada cuádruple debería dar como resultado una diferencia de C_q de aproximadamente 2 ciclos. Todas las muestras se amplificaron correctamente en ambos volúmenes de entrada.

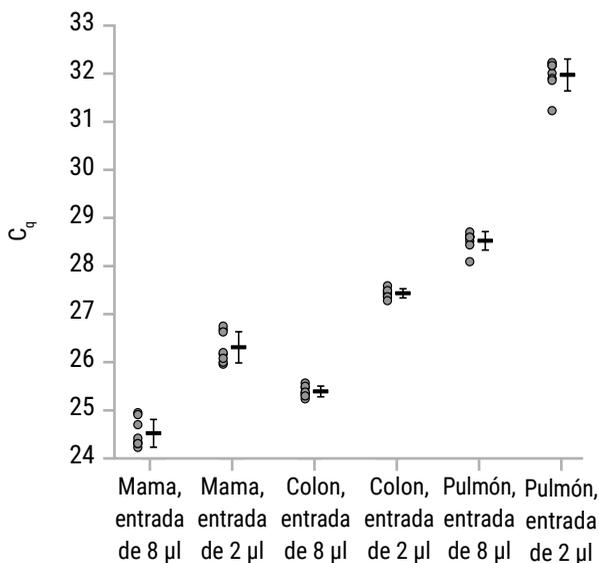


Figura 4. Valores de C_q de RT-qPCR, media y desviación estándar para eluatos preparados con secciones FFPE de mama, colon y pulmón. Para cada conjunto de muestras, los puntos de la izquierda representan los valores C_q de las muestras individuales, mientras que la media con la desviación estándar se muestra a la derecha.

8.B. Reproducibilidad

Tabla 2. Reproducibilidad a través de usuarios. Para evaluar la variabilidad del usuario, se juntaron muestras de tejido FFPE preprocesadas y luego se extrajeron mediante el uso del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit y del Maxwell® CSC Instrument. Los eluidos se amplificaron en el ensayo RT-qPCR dirigido al gen HPRT1 y las concentraciones de ARN se calcularon a partir del valor de C_q . A continuación se muestran los promedios y el coeficiente de variación porcentual (% CV) para la concentración de ARN obtenida de eluidos a través de 3 usuarios diferentes.

		Concentración (ng/μl)	Desviación estándar (ng/μl)	% CV
Número de usuario	1 (n = 8)	1,47	0,123	8,4
	2 (n = 8)	1,45	0,082	5,7
	3 (n = 7)*	1,39	0,100	7,2
Promedio de tres usuarios diferentes		1,44	0,104	7,2

*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.

8.C. Sustancias de interferencias (inhibición)

Tabla 3. Inhibición de sustancias endógenas en la muestra. Los eluatos se prepararon a partir de muestras de tejido FFPE de mama, pulmón y colon mediante el uso del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit y del Maxwell® CSC Instrument. Las muestras (2 μl y 8 μl) de cada eluato se amplificaron en el RT-qPCR dirigido al gen HPRT y se calculó el ΔC_q (diferencia entre los promedios de C_q para cada volumen de entrada de eluato). El ΔC_q entre las entradas 2 μl y 8 μl estaba comprendida entre 1,94 y 2,04 ciclos. Un ΔC_q entre las entradas de volumen de 2 ciclos corresponde a una inhibición no detectable de amplificación del ADN. No se detectó inhibición para ninguno de los tejidos evaluados.

Tejido (n = 8)	C_q para entrada de 8 μl (ciclos)	C_q para entrada de 2 μl (ciclos)	ΔC_q
FFPE de mama	24,52	26,46	1,94
FFPE de colon	25,39	27,43	2,04
FFPE de pulmón	28,52	30,49	1,96

8.D. Contaminación cruzada

Se purificó ARN de 8 muestras diferentes de tejido FFPE y 8 muestras de control negativo mediante el uso del Maxwell® CSC Instrument y del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Los cartuchos Maxwell® que contenían muestras de tejido FFPE y los cartuchos Maxwell® que contenían control negativo (agua) se procesaron en posiciones alternadas en la plataforma en el Maxwell® CSC Instrument, y los eluatos resultantes se evaluaron por duplicado mediante el RT-qPCR dirigido al HPRT1 para buscar contaminación de ARN de los controles negativos de muestras colindantes. Se observó ARN no contaminante en los controles negativos.

9. Evaluación del rendimiento clínico

Un laboratorio clínico externo evaluó el rendimiento clínico del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit mediante el uso de muestras de tejido FFPE y el Maxwell® CSC Instrument.

9.A. Cantidad, calidad y amplificabilidad del ARN

Tabla 4. Comparación de métodos. Se purificó ARN de 15 muestras de tejido FFPE mediante el uso del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit y mediante el método de extracción estándar del laboratorio (método de referencia del laboratorio), después se amplificó mediante el RT-qPCR dirigido al gen HPRT1 y los resultados de C_q de los dos métodos comparados. El ARN purificado mediante el uso del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit se amplificó para todas las muestras y proporcionó valores de C_q de entre 25,86 y 35,35. Los eluatos preparados usando el método de referencia del laboratorio no se pudieron amplificar para 3 de las 15 muestras evaluadas. Los 3 eluatos que no se amplificaron tenían valores de C_q superiores a los eluatos de las mismas muestras preparadas mediante el Maxwell® CSC RNA FFPE Kit.

Muestra de tejido FFPE	Promedio de C_q	
	Maxwell® CSC	Método de referencia del laboratorio
1	29,55	33,78
2	35,35	Sin C_q
3	25,86	31,37
4	27,75	34,49
5	32,27	Sin C_q
6	33,02	34,49
7	32,69	Sin C_q
8	27,60	36,49
9	31,43	36,77
10	30,35	34,06
11	33,00	35,83
12	31,71	33,39
13	31,27	35,49
14	30,98	34,75
15	33,18	43,71

9.B. Reproducibilidad

Tabla 5. Reproducibilidad de evaluador a evaluador. Para confirmar la consistencia de resultados entre evaluadores en el entorno típico de evaluador, dos evaluadores extrajeron por separado ARN de ocho muestras de tejido FFPE mediante el uso del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit y del Maxwell® CSC Instrument. Los eluatos resultantes se amplificaron mediante el uso del RT-qPCR dirigido al gen HPRT1, y los resultados obtenidos de cada muestra se compararon entre los dos evaluadores.

Muestra de tejido FFPE	Promedio de C _q	
	Evaluador 1	Evaluador 2
1	29,55	28,30
2	35,35	35,31
3	25,86	26,39
4	27,75	25,92
5	32,64	32,72
6	28,45	27,72
7	31,93	29,70
8	28,09	27,03

9.C. Contaminación cruzada

Para confirmar que no haya contaminación cruzada entre muestras en el entorno típico del usuario, se purificó ARN de 8 muestras diferentes de tejido FFPE y 8 muestras de control negativo (agua) mediante el uso del Maxwell® CSC Instrument y del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Los cartuchos Maxwell® que contenían muestras de tejido FFPE y los cartuchos Maxwell® que contenían control negativo (agua) se procesaron en posiciones alternadas en la plataforma en el Maxwell® CSC Instrument. Los eluatos de muestras y los eluatos de control negativo se evaluaron por duplicado mediante el RT-qPCR dirigido al gen HPRT1 para determinar si hubo contaminación cruzada en las muestras negativas. Ocho de 8 muestras negativas dieron resultados negativos, lo que confirmó que no hubo contaminación cruzada detectable.

10. 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 sección FFPE típica debería producir ARN amplificable en función del tamaño y la celularidad del tejido, el estado de la fijación mediante formalina y el manejo del tejido).

Causas y comentarios

Se ha evaluado el rendimiento del kit mediante el aislamiento del ARN de muestras de tejido FFPE de tamaños comprendidos entre 0,1 mm³ y 2,0 mm³. Use secciones comprendidas en este rango.

El kit se ha diseñado para usarse con muestras de tejido FFPE tomadas de mama, pulmón o colon humanos. Es posible que los tiempos de incubación y las temperaturas no sean óptimos para otros tipos de muestra.

El kit no se ha diseñado para usarse con muestras de tejido preparadas con fijadores distintos a la formalina tamponada neutra al 10 %. Confirme que no se ha empleado un fijador alternativo.

Pueden haberse introducido ARNasas durante el procesamiento o la cuantificación de las muestras. Consulte la sección 11 para obtener información sobre la creación de un entorno sin ribonucleasa.

Se ha usado tejido de una barra corredera o sección teñida. No se puede reclamar por barras correderas o secciones teñidas. Repita la purificación con una barra corredera o una sección sin teñir.

Se ha evaluado el rendimiento del kit en función de la purificación del ARN amplificable. Otros medios de cuantificación, incluidas la absorbancia y la fijación de colorante fluorescente, pueden no ser compatibles con la amplificación. Aplique un método de cuantificación de la amplificación para evaluar el rendimiento.

10. Solución de problemas (continuación)

Síntomas

Calidad menor de lo esperado
(el eluato contiene ARN muy fragmentado
o inhibidores de ensayos posteriores).

Causas y comentarios

La fijación mediante formalina y la posterior inversión de la reticulación provoca la fragmentación del ARN. Si se fragmenta el ARN antes de la extracción y la purificación, el ARN fragmentado se purificará con este kit. Repita el procedimiento con una sección adyacente para evaluar si hay un problema con la sección seleccionada o con el proceso.

Algunos ensayos basados en amplificación son especialmente sensibles a la presencia de inhibidores. Las comprobaciones del ensayo posterior deberán identificar la presencia de un inhibidor de amplificación en el eluato. El usuario es el responsable de verificar la compatibilidad de este producto con todos los ensayos posteriores.

ADN presente en eluatos
(los eluatos están contaminados con ADN, lo
que puede afectar a los ensayos posteriores).

La mezcla de ADNasa añadida a la muestra proporciona un exceso de actividad de ADNasa cuando se utiliza con muestras de tejido FFPE de tamaños comprendidos entre 0,1 mm³ y 2,0 mm³. No se ha diseñado para muestras fuera de este rango y puede resultar poco adecuada. Use secciones comprendidas en este rango.

Si la mezcla de ADNasa no se mezcla lo suficiente en la muestra durante el preprocesamiento, puede producirse una degradación incompleta del ADN. Asegúrese de mezclar completamente la mezcla de ADNasa en la muestra.

Si los componentes de la mezcla de ADNasa se añaden a la muestra de uno en uno, asegúrese de añadirlos en el orden indicado en la sección 5.A, paso 10. Asimismo, asegúrese de mezclar por completo cada componente en cuanto lo añada. Añadir componentes en un orden diferente o mezclar de forma incompleta puede desactivar la ADNasa.

Se deberá comunicar de inmediato al fabricante todo incidente grave que se produjera en relación con el dispositivo médico y que provocara (o pudiera provocar) la muerte o una lesión grave a un usuario o paciente. Los usuarios residentes de 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.

11. 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 solo está disponible en una cantidad limitada. Las siguientes indicaciones le ayudarán a evitar la contaminación accidental de sus muestras con ARNasa.

1. Dos de las fuentes más frecuentes 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 aséptica cuando tenga que 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, utilice 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 no estériles antes de usarlos 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.
4. Trate las soluciones no suministradas con el sistema añadiendo pirocarbonato de dietilo (DEPC, por sus siglas en inglés) al 0,1 % 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 usarse 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.

12. Bibliografía

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

13. 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 kits de purificación de Maxwell® CSC disponibles.

14. Resumen de las modificaciones

Se han realizado las siguientes modificaciones a la revisión 11/22 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 8 y 9.
3. Se ha actualizado el documento de conformidad con el Reglamento (UE) 2017/746 en dispositivos médicos para diagnóstico in vitro.

^(a)Número de patente de EE. UU. 7 329 488 y número de patente de Corea 10-0483684.

© 2013–2022 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.