

MANUALE TECNICO

Maxwell® CSC RNA FFPE Kit

Istruzioni per l'uso del prodotto
AS1360

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



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germania



ISTRUZIONI PER L'USO
DEL PRODOTTO
AS1360



Revisione 11/22
TM404

Maxwell® CSC RNA FFPE Kit

Tutta la letteratura tecnica è disponibile via Internet all'indirizzo: www.promega.com/protocols/
 Visitare il sito web per verificare che la versione in uso del presente manuale tecnico sia quella più aggiornata.
 In caso di domande sull'utilizzo del prodotto, contattare
 i Promega Technical Services all'indirizzo e-mail: techserv@promega.com

| | |
|---|----|
| 1. Descrizione | 2 |
| 2. Componenti del prodotto, condizioni di conservazione e legenda dei simboli | 3 |
| 3. Finalità prevista/uso previsto del prodotto..... | 5 |
| 4. Limitazioni all'utilizzo del prodotto | 5 |
| 5. Prima di iniziare | 6 |
| 5.A. Preparazione dei campioni FFPE | 6 |
| 5.B. Preparazione della Maxwell® CSC RNA FFPE Cartridge..... | 7 |
| 6. Corsa dello strumento | 9 |
| 7. Post-purificazione | 11 |
| 8. Valutazione delle prestazioni analitiche | 12 |
| 8.A. Quantità, qualità e amplificabilità dell'RNA | 12 |
| 8.B. Riproducibilità | 13 |
| 8.C. Sostanze interferenti (inibizione)..... | 13 |
| 8.D. Contaminazione crociata | 14 |
| 9. Valutazione delle prestazioni cliniche | 14 |
| 9.A. Quantità, qualità e amplificabilità dell'RNA | 14 |
| 9.B. Riproducibilità | 15 |
| 9.C. Contaminazione crociata | 15 |
| 10. Risoluzione dei problemi | 16 |
| 11. Creazione di un ambiente privo di ribonucleasi | 18 |
| 12. Bibliografia..... | 18 |
| 13. Prodotti correlati | 19 |
| 14. Riepilogo delle modifiche..... | 19 |

Maxwell® CSC RNA FFPE Kit è disponibile solo in alcuni Paesi.

1. Descrizione

Il Maxwell® CSC RNA FFPE Kit^(a) viene usato in combinazione con i Maxwell® CSC Instrument specificati nella Tabella 1 per fornire un metodo semplice per la purificazione efficiente e automatica dell'RNA di tessuto umano FFPE (fissato in formalina e incluso in paraffina) proveniente da mammella, polmone o colon. I Maxwell® CSC Instrument sono progettati per essere utilizzati con le cartucce di reagenti predosati e con reagenti aggiuntivi forniti nel kit, con metodi di purificazione preprogrammati, massimizzando così la semplicità e la facilità d'uso. I Maxwell® CSC Instrument possono processare da uno al numero massimo di campioni consentito in circa 45 minuti; l'RNA purificato può essere usato direttamente in applicazioni a valle basate sull'amplificazione, come RT-PCR.

Tabella 1. Strumenti supportati

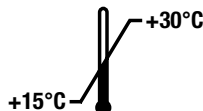
| Strumento | Cat.# | Manuale tecnico |
|-----------------|--------|-----------------|
| Maxwell® CSC | AS6000 | TM457 |
| Maxwell® CSC 48 | AS8000 | TM623 |

Principio del metodo: Maxwell® CSC RNA FFPE Kit purifica l'acido nucleico utilizzando particelle paramagnetiche, fornendo una fase solida mobile per ottimizzare la cattura dei campioni, il lavaggio e la purificazione dell'RNA. I Maxwell® CSC Instrument sono strumenti per la gestione delle particelle paramagnetiche. Il sistema consente un legame efficiente dell'RNA alle particelle paramagnetiche nella prima camera di una cartuccia preriempita e sposta il campione attraverso le camere della cartuccia. Questo approccio alla cattura magnetica evita problemi frequenti associati a sistemi di gestione di liquidi, quali puntali coagulati o trasferimenti di reagente parziali, che con altri sistemi automatizzati comunemente usati portano ad un'elaborazione della purificazione non ottimale.

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

| PRODOTTO | QUANTITÀ | CAT.# |
|---------------------------|----------|--------|
| Maxwell® CSC RNA FFPE Kit | 48 prep | AS1360 |

Per uso diagnostico in vitro. Esclusivamente ad uso professionale. Sufficiente per 48 isolamenti automatici di campioni FFPE. Le cartucce Maxwell® CSC Cartridge sono esclusivamente mono-uso.



Include:

- 25 ml Olio minerale
- 20 ml Tampone di lisi
- 2 × 1 ml Proteinasi K
- 100 µl Colorante blu
- 2 × 1 ml MnCl₂, 0,09 M
- 1 ml Tampone per DNasi
- 3 fiale DNasi I (liofilizzata)
- 48 Maxwell® FFPE Cartridges
- 50 Stantuffi CSC/RSC
- 50 Provette di eluizione (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

Condizioni di conservazione: conservare Maxwell® CSC RNA FFPE Kit tra +15°C e +30°C. Conservare la DNasi I reidratata tra -30°C e -10°C. Non congelare-scongellare più di 10 volte.



Informazioni sulla sicurezza: le cartucce di contengono etanolo e isopropanolo. Queste sostanze devono essere considerate infiammabili, pericolose e irritanti.



I componenti del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit sono progettati per essere utilizzati con sostanze potenzialmente infettive. Indossare dispositivi di protezione individuale (p. es., guanti e occhiali sicurezza) durante la manipolazione di sostanze infettive. Attenersi alle linee guida della propria struttura per la gestione e lo smaltimento di tutte le sostanze infettive utilizzate con questo sistema.



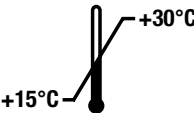













Attenzione: maneggiare le cartucce con attenzione; i bordi del sigillo possono essere taglianti.

Informazioni aggiuntive: i componenti del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit sono qualificati e comprovati per funzionare insieme. Non è consigliato il mescolamento dei componenti di un kit tra lotti di kit differenti. Usare solo i componenti forniti nel kit. Non utilizzare le cartucce se il sigillo sulla cartuccia non è intatto al momento della ricezione.

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

Legenda dei simboli

| Simbolo | Spiegazione | Simbolo | Spiegazione |
|---|---|---|------------------------------------|
|  | Dispositivo medico diagnostico in vitro |  | Rappresentante autorizzato |
|  | Conservare tra +15°C e +30°C. |  | Fabbricante |
|  | Attenzione |  | Irritante |
|  | Rischio per la salute |  | Contenuto sufficiente per “n” test |
|  | Conformità alle normative europee |  | Avvertenza. Rischio biologico. |
|  | Avvertenza. Pericolo di schiacciamento. |  | Numero catalogo |
|  | Numero lotto |  | Non riutilizzare |

3. Finalità prevista/uso previsto del prodotto

Maxwell® CSC RNA FFPE Kit è destinato all'uso come dispositivo medico-diagnostico in vitro (IVD) per l'isolamento automatico dell'RNA da campioni di tessuto umano FFPE (fissato in formalina e incluso in paraffina) provenienti da mammella, polmone o colon, in combinazione con Maxwell® CSC Instrument e il metodo di purificazione Maxwell® CSC RNA FFPE. L'RNA purificato è adatto per l'impiego in analisi diagnostiche in vitro basate sull'amplificazione.

Maxwell® CSC RNA FFPE Kit è previsto per un impiego ad una temperatura ambiente compresa tra 15°C e 30°C. L'impiego al di fuori di questo intervallo di temperatura può comportare risultati non ottimali.

I campioni FFPE preparati con formalina 10% neutra tamponata possono essere impiegati con Maxwell® CSC RNA FFPE Kit.

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

4. Limitazioni all'utilizzo del prodotto

Le prestazioni di Maxwell® CSC RNA FFPE Kit sono state valutate usando campioni di tessuto FFPE prelevati da mammella, polmone o colon umani. Non è destinato all'uso con campioni di tessuto diversi dai FFPE, come ad esempio campioni di tessuto freschi o congelati. Maxwell® CSC RNA FFPE Kit non deve essere utilizzato con altri tipi di campioni, inclusi campioni non umani, o per la purificazione di DNA.

Maxwell® CSC RNA FFPE Kit non deve essere utilizzato con campioni di tessuto che siano stati preparati con fissativi diversi dalla formalina 10% neutra tamponata.

Le prestazioni di Maxwell® CSC RNA FFPE Kit sono state valutate isolando l'RNA da campioni di tessuto FFPE di dimensioni comprese tra 0,1–2,0 mm³.

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

5. Prima di iniziare

Fornitura materiali a cura dell'utente

- microcentrifuga
- pipette e puntali per la pre-elaborazione e il trasferimento del campione nelle cartucce preriempite di reagente
- provette da 1,5–2,0 ml per l'incubazione dei campioni (p. es., Microtubes, 1,5 ml; Cat.# V1231)
- blocchi di riscaldamento regolati a 56°C e a 80°C
- campioni FFPE con un volume tissutale totale di 0,1–2,0 mm³; lo spessore della sezione non dovrà superare 5 µm (**nota:** i campioni devono essere conservati a temperatura ambiente [15–30°C])



- lamette da barba (**nota:** fare attenzione durante l'utilizzo delle lamette per raschiare il tessuto dal vetrino)

Ricostituire al bisogno una fiala di DNasi I liofilizzata con 275 µl di Nuclease-Free Water. Rovesciare la fiala per lavare via dal tappo la DNasi I e girare delicatamente per mescolare; non mescolare con l'agitatore.

5.A. Preparazione dei campioni FFPE

Mantenere l'ambiente privo di RNasi durante l'elaborazione. Usare sempre puntali ART (Aerosol Resistant Tips) e privi di RNasi. Cambiare spesso i guanti per ridurre le possibilità di contaminazione con RNasi. Vedere la Sezione 11, Creazione di un ambiente privo di ribonucleasi, per maggiori informazioni.

Pre-elaborazione dei campioni della sezione

1. Porre la sezione in una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml. Se si impiegano sezioni di tessuto montate su vetrino, raschiare la sezione dal vetrino tramite una lametta da barba pulita.
2. Aggiungere 300 µl di olio minerale alle provette del campione. Mescolare tramite agitatore per 10 secondi.
3. Scaldare i campioni a 80°C per 2 minuti. Riporre i campioni a temperatura ambiente durante la preparazione della master mix.
4. Preparare una master mix di tampone di lisi, Proteinasi K e colorante blu come mostrato di sotto:

| Reagente | Quantità/reazione | Reazioni | |
|-----------------|-------------------|--------------------------|------------------|
| | | (numero da eseguire + 1) | Totale |
| Tampone di lisi | 224 µl | n + 1 | 224 µl × (n + 1) |
| Proteinasi K | 25 µl | n + 1 | 25 µl × (n + 1) |
| Colorante blu | 1 µl | n + 1 | 1 µl × (n + 1) |

5. Aggiungere 250 µl di master mix a ciascuna provetta di campione e mescolare tramite agitatore per 5 secondi.
6. Centrifugare le provette di campione a 10.000 × g per 20 secondi per separare gli strati. Se lo strato acquoso (strato blu inferiore) contiene un pellet, mescolare delicatamente per dissipare il pellet. Lasciare ambedue le fasi nella provetta.

7. Trasferire le provette di campione nel blocco di riscaldamento a 56°C e incubare per 15 minuti.
8. Trasferire le provette di campione nel blocco di riscaldamento a 80°C e incubare per 1 ora.
9. Togliere le provette di campione dal blocco di riscaldamento e lasciar raffreddare i campioni a temperatura ambiente per 15 minuti. Durante il raffreddamento dei campioni, preparare il cocktail di DNasi come descritto nel passaggio 10.
10. Preparare un cocktail di $MnCl_2$, tampone per DNasi e DNasi I nell'ordine elencato di sotto:

| Reagente ¹ | Quantità/reazione | Reazioni | Totale |
|--------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------|
| | | (numero da eseguire + 1) | |
| $MnCl_2$, 0,09 M | 26 μ l | n + 1 | 26 μ l \times (n + 1) |
| Tampone per DNasi ² | 14 μ l | n + 1 | 14 μ l \times (n + 1) |
| DNasi I ³ | 10 μ l | n + 1 | 10 μ l \times (n + 1) |

¹Se i reagenti del cocktail di DNasi vengono aggiunti singolarmente alle provette di campione, assicurarsi di aggiungerli nell'ordine elencato sopra. Incorporare ciascun reagente pipettando accuratamente prima di aggiungere il successivo.

²Conservare il tampone per DNasi a 15–30°C; può precipitare se conservato a temperature inferiori. Se il tampone contiene depositi, risolubilizzare il precipitato scaldando a 56°C per 2 minuti e poi mescolando brevemente con l'agitatore.

³Conservare la DNasi I ricostituita rimanente tra –30 e –10°C.

11. Aggiungere 50 μ l di DNasi A alla fase blu acquosa di ogni provetta campione. Mescolare pipettando 10 volte.
12. Incubare le provette di campione per 15 minuti a temperatura ambiente (15–30°C). Durante questa incubazione, preparare le cartucce come descritto nella Sezione 5.B.
13. Centrifugare le provette di campione alla massima velocità in una microcentrifuga per 5 minuti.
14. Trasferire immediatamente la fase blu acquosa nella camera n.1 di una RNA FFPE Maxwell® CSC Cartridge.

5.B. Preparazione della Maxwell® CSC RNA FFPE Cartridge

1. Cambiare guanti prima di maneggiare cartucce Maxwell® FFPE Cartridge, stantuffi CSC/RSC e provette di eluizione. Le cartucce vengono preparate nell'apposito vassoio esterno allo strumento e i vassoi che contengono le cartucce ed i campioni vengono trasferiti nello strumento per la purificazione. Porre ciascuna cartuccia nel vassoio con la camera n.1 (la camera più ampia nella cartuccia) al massimo della distanza dalle provette di eluizione (Figura 2). Premere sulla cartuccia fino a quando non scatta in posizione. Assicurarsi che ambedue le estremità della cartuccia siano completamente inserite nel vassoio. Staccare delicatamente il sigillo in modo che venga completamente rimosso dalla parte superiore della cartuccia. Assicurarsi che siano stati rimossi dalla cartuccia il nastro sigillante e qualunque residuo di adesivo.



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

2. Posizionare uno stantuffo nella camera n.8 di ciascuna cartuccia.

5.B. Preparazione della Maxwell® CSC RNA FFPE Cartridge (continua)

3. Porre nell'apposita posizione una provetta di eluizione vuota per ciascuna cartuccia del vassoio.

Nota: usare esclusivamente le provette di eluizione a corredo di Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Altre provette di eluizione possono non essere compatibili con Maxwell® CSC Instrument e interferire con la purificazione dell'RNA.

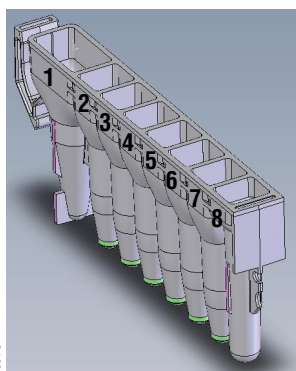
4. Aggiungere 50 µl di Nuclease-Free Water sul fondo di ciascuna provetta di eluizione. Le provette di eluizione devono rimanere aperte durante la purificazione dell'RNA.

Nota: usare esclusivamente l'Nuclease-Free Water a corredo di Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. L'utilizzo di altri tamponi di eluizione può interferire con la purificazione dell'RNA o l'impiego a valle.

Note sulla preparazione della Maxwell® CSC RNA FFPE Cartridge



Eventuali fuoriuscite di campione o reagente su qualunque parte del vassoio devono essere pulite con una soluzione a base d'acqua e detergente, per applicare poi uno spray battericida, oppure strofinando e lavando nuovamente con acqua. Non usare candeggina su nessuna parte dello strumento.



Componenti aggiunti dall'utente al contenuto delle camere:

1. Campioni pre-elaborati
8. Stantuffo CSC/RSC

Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge. Il campione FFPE pre-elaborato viene aggiunto alla camera n.1; uno stantuffo viene aggiunto alla camera n.8.



Figura 2. Preparazione e allestimento del vassoio. Nuclease-Free Water viene aggiunta alle provette di eluizione come indicato.

6. Corsa dello strumento

Il Maxwell® CSC RNA FFPE Method per il Maxwell® CSC Instrument può essere scaricato dalla pagina Web Promega: www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod. Il Maxwell® CSC RNA FFPE Method per il Maxwell® CSC 48 Instrument può essere scaricato dalla pagina Web Promega: www.promega.com/resources/tools/maxwellcsc48method

Se si ritiene che lo strumento possa essere stato contaminato da RNasi, pulirlo prima dell'utilizzo usando una soluzione detergente come Steris LpH®. Seguire le istruzioni nell'apposita sezione di pulizia e manutenzione del *manuale d'uso n.TM457 per il Maxwell® CSC Instrument* o del *manuale d'uso n.TM623 del Maxwell® CSC 48 Instrument*.

1. Accendere Maxwell® Instrument e il Tablet PC. Accedere al tablet PC e avviare il software Maxwell® IVD mode toccando due volte l'icona sul desktop. Lo strumento procederà a un'auto-verifica e tutte le parti mobili verranno portate nella posizione base.
2. Selezionare **Avvia** nella schermata iniziale.
3. Leggere o digitare il codice a barre nell'angolo in alto a destra dell'etichetta del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit e toccare **OK** per selezionare automaticamente il metodo da eseguire (Figura 3).

Nota: il codice a barre del metodo del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit è necessario per la purificazione dell'RNA con Maxwell® CSC Instrument. L'etichetta del kit contiene due codici a barre. Il codice a barre del metodo è indicato nella Figura 3. Se il codice a barre non è leggibile, contattare i Promega Technical Services.



Figura 3. Etichetta del kit con l'indicazione del codice a barre da leggere. Leggere il codice a barre, mostrato nel riquadro rosso sulla parte superiore destra dell'etichetta kit reagente, per avviare un ciclo di purificazione.

4. Nella schermata 'Impostazione cartuccia' toccare le posizioni della cartuccia per selezionare/deselezionare le posizioni da usare per questo ciclo di estrazione. Immettere eventuali informazioni di tracciabilità richieste per il campione e toccare il pulsante **Procedi** per continuare.

Nota: quando si usa il Maxwell® CSC 48 Instrument, toccare il pulsante **Anteriore** o **Posteriore** per selezionare o deselectare le posizioni delle cartucce su ciascun vassoio.

6. Corsa dello strumento (continua)

5. Una volta aperto lo sportello, confermare che tutte le voci della lista di controllo estrazione sono state eseguite. Verificare che: i campioni pre-elaborati siano stati aggiunti alla camera n.1 delle cartucce, le cartucce siano caricate sullo strumento, le provette di eluizione stappate siano presenti con tampone di eluizione e gli stantuffi siano nella camera n.8. Trasferire il vassoio contenente le cartucce preparate sulla piattaforma del Maxwell® Instrument.

Inserimento del vassoio Maxwell®: tenere il vassoio dai lati per evitare di spostare le cartucce dal vassoio. Assicurarsi che il vassoio sia posizionato nel Maxwell® Instrument con le provette di eluizione il più vicino possibile allo sportello. Inclinare la parte posteriore del vassoio verso il basso e inserirla dentro lo strumento in modo che la parte posteriore del vassoio sia a contatto con la parte posteriore della piattaforma dello strumento. Premere la parte frontale del vassoio per fissarlo saldamente sulla piattaforma dello strumento. Se si riscontrano difficoltà nel posizionare il vassoio sulla piattaforma, verificare che il vassoio sia orientato correttamente. Accertarsi che il vassoio sia a livello con la piattaforma dello strumento e ben posizionato.

Nota: controllare l'identificativo sui vassoi Maxwell® a 24 posizioni per stabilire se devono essere posizionati nella parte anteriore o posteriore dello strumento.

6. Confermare che tutti i passaggi di pre-elaborazione sono stati eseguiti e toccare **Avvia** per chiudere lo sportello dello strumento e avviare l'elaborazione.

Nota: quando si usa un Maxwell® Instrument a 48 posizioni, se è stato abilitato il Vision System i vassoi saranno letti quando lo sportello si ritrae. Qualsiasi errore nella configurazione dei vassoi (p. es., stantuffi non nella camera n.8, provette di eluizione non presenti e aperte) causerà il ritorno del software alla schermata 'Impostazione cartuccia' e le posizioni problematiche saranno contrassegnate con un punto esclamativo racchiuso in un cerchio rosso. Toccare il punto esclamativo per visualizzare la descrizione dell'errore e risolvere tutti gli stati di errore. Toccare di nuovo il pulsante **Avvia** per ripetere la lettura dei vassoi e iniziare il ciclo di estrazione.



Avvertenza: pericolo di schiacciamento.

7. Maxwell® Instrument inizierà immediatamente il ciclo di purificazione. La schermata visualizzerà i passaggi eseguiti e una stima del tempo rimanente per la fine della corsa.

Note:

1. Toccando il pulsante **Interrompi** il ciclo sarà abbandonato. Tutti i campioni di un ciclo interrotto andranno persi.
 2. Se il ciclo viene annullato prima che sia completato, potrebbe essere richiesto di controllare se gli stantuffi sono ancora caricati nell'apposita barra. Se nella barra sono presenti degli stantuffi, è necessario eseguire la **Rimozione Stantuffi** quando richiesto. Se non ci sono stantuffi nell'apposita barra, si può scegliere di saltare la **Rimozione Stantuffi** quando richiesto. I campioni andranno persi.
8. Una volta completato il ciclo, l'interfaccia utente visualizzerà un messaggio indicante che il metodo è stato completato.

Fine del ciclo

9. Seguire le istruzioni a schermo al termine del metodo per aprire lo sportello. Verificare che gli stantuffi si trovino nella camera n.8 della cartuccia al termine del ciclo. Se gli stantuffi non vengono rimossi dalla barra, seguire le istruzioni del manuale d'uso del Maxwell® Instrument in uso (vedere la Tabella 1) per eseguire un processo di **Rimozione Stantuffi** per cercare di scaricare gli stantuffi.

10. Tappare e rimuovere le provette di eluizione contenenti RNA subito dopo la corsa per evitare l'evaporazione degli eluiti. Rimuovere il vassoio Maxwell® dallo strumento.

Nota: per rimuovere il vassoio dalla piattaforma dello strumento, tenerlo ai lati. Assicurarsi che i campioni vengano rimossi dallo strumento prima di eseguire un protocollo di igienizzazione UV per evitare di danneggiare l'acido nucleico purificato. I campioni di RNA possono essere conservati per la notte tra -30 e -10°C o a lungo termine a temperature inferiori a -60°C.



11. Rimuovere le cartucce e gli stantuffi dal vassoio Maxwell® e smaltirli come rifiuti pericolosi secondo le procedure in vigore presso la propria struttura. Cartucce, stantuffi e provette di eluizione devono essere utilizzati una sola volta. Non riutilizzare Maxwell® CSC Cartridges, stantuffi CSC/RSC o provette di eluizione.

7. Post-purificazione

Stabilisce se la resa del campione di RNA purificato è conforme ai requisiti di ingresso dell'analisi diagnostica a valle prima di impiegarlo in tale analisi. Le prestazioni del kit sono state valutate sulla base della purificazione di RNA amplificabile. Altri mezzi di quantizzazione, quali l'assorbanza o il legame di colorante fluorescente, possono non correlare con l'amplificazione (1). Le letture di assorbanza per campioni FFPE purificate possono sovrastimare la resa; si raccomanda l'utilizzo di metodi più specifici per la determinazione di quest'ultima (1).

8. Valutazione delle prestazioni analitiche

Le prestazioni analitiche del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit sono state valutate usando campioni di tessuto FFPE prelevati da mammella, polmone o colon umani sul Maxwell® CSC Instrument. Inoltre, il Maxwell® CSC RNA FFPE Kit è stato valutato con il Maxwell® CSC 48 Instrument per dimostrare che le prestazioni del kit sono equivalenti su entrambi gli strumenti.

8.A. Quantità, qualità e amplificabilità dell'RNA

La quantità, la qualità e l'amplificabilità dell'RNA sono state valutate per eluiti preparati da sezioni di campioni FFPE provenienti da mammella, colon e polmone utilizzando il Maxwell® CSC RNA FFPE Kit e il Maxwell® CSC Instrument. Campioni (2 µl e 8 µl) di ogni eluito sono stati testati mediante un'analisi della RT-qPCR mirata a un gene costitutivo, HPRT1 (ipoxantina fosforibosiltransferasi 1). L'immissione dell'eluito nella RT-qPCR a 2 µl e 8 µl è stata utilizzata per valutare l'inibizione, poiché una differenza di volume immesso pari a quattro volte dovrebbe risultare in una differenza nel valore C_q di circa 2 cicli. Tutti i campioni sono stati amplificati con successo in entrambi i volumi immessi.

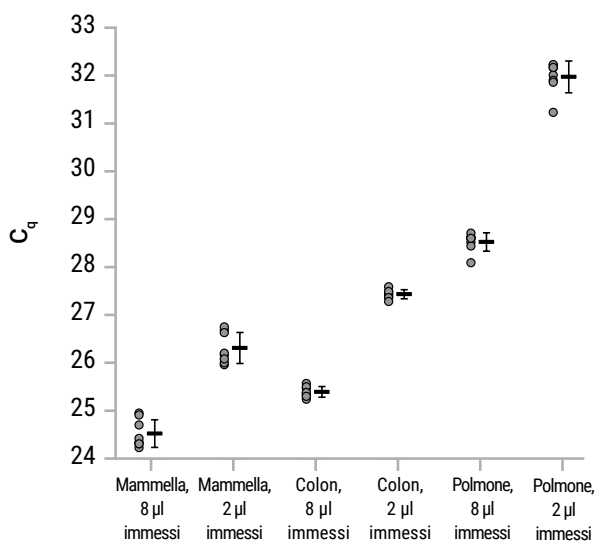


Figura 4. Valori C_q , media e deviazione standard della RT-qPCR per eluiti preparati da sezioni FFPE prelevati da mammella, colon e polmone. Per ogni set di campioni, i punti sulla sinistra rappresentano i valori C_q dei singoli campioni, mentre la media con la deviazione standard si trova sulla destra.

8.B. Riproducibilità

Tabella 2. Riproducibilità tra gli utenti. Per valutare la variabilità degli utenti, i campioni di tessuto FFPE pre-elaborati sono stati raggruppati e poi estratti utilizzando il Maxwell® CSC RNA FFPE Kit e il Maxwell® CSC Instrument. Gli eluiti sono stati amplificati in un'analisi della RT-qPCR mirata al gene HPRT1 e le concentrazioni di RNA sono state calcolate dal valore C_q . Le medie e il coefficiente di variazione percentuale (% CV) per la concentrazione di RNA ottenuta dagli eluiti sono stati calcolati attraverso 3 diversi utenti e sono mostrati di seguito.

| | | Concentrazione (ng/μl) | Deviazione standard (ng/μl) | % CV |
|---------------------------------------|------------|---------------------------|--------------------------------|------------|
| Numero utente | 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 |
| Media di tre utenti differenti | | 1,44 | 0,104 | 7,2 |

*Il Dixon's Outlier Test ha permesso di escludere un replicato in questo set come eccezione alla soglia di confidenza del 95%. Questo replicato è stato escluso dall'analisi.

8.C. Sostanze interferenti (inibizione)

Tabella 3. Inibizione da sostanze endogene nel campione. Gli eluiti sono stati preparati da campioni di tessuto FFPE provenienti da mammella, polmone e colon utilizzando il Maxwell® CSC RNA FFPE Kit e il Maxwell® CSC Instrument. Campioni (2 μl e 8 μl) di ogni eluito sono stati amplificati nella RT-qPCR mirata al gene HPRT e l'intervallo dei valori ΔC_q (differenza tra il C_q medio per ogni volume immesso di eluito) calcolato. L'intervallo ΔC_q tra i volumi immessi da 2 μl e 8 μl è stato tra 1,94 e 2,04 cicli. Un intervallo ΔC_q di 2 cicli tra i volumi immessi significa che non c'è alcuna inibizione rilevabile dell'amplificazione del DNA. Non è stata rilevata alcuna inibizione per nessuno dei tessuti testati.

| Tessuto (n = 8) | C_q con 8 μl immessi (cicli) | C_q con 2 μl immessi (cicli) | ΔC_q |
|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|
| FFPE da mammella | 24,52 | 26,46 | 1,94 |
| FFPE da colon | 25,39 | 27,43 | 2,04 |
| FFPE da polmone | 28,52 | 30,49 | 1,96 |

8.D. Contaminazione crociata

L'RNA è stato purificato da 8 diversi campioni di tessuto FFPE e da 8 campioni di controllo negativo utilizzando il Maxwell® CSC Instrument e il Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Le cartucce Maxwell® contenenti campioni di tessuto FFPE e le cartucce Maxwell® contenenti il controllo negativo (acqua) sono state elaborate in posizioni dei vassoi alternate sul Maxwell® CSC Instrument e gli eluiti risultanti sono stati analizzati in duplicato con una RT-qPCR mirata all'HPRT1 per verificare la contaminazione di RNA dei controlli negativi dai campioni vicini. Non è stato osservato alcun RNA contaminante nei controlli negativi.

9. Valutazione delle prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche del Maxwell® CSC RNA FFPE Kit sono state valutate da un laboratorio clinico esterno usando campioni di tessuto umano FFPE e il Maxwell® CSC Instrument.

9.A. Quantità, qualità e amplificabilità dell'RNA

Tabella 4. Confronto dei metodi. L'RNA è stato purificato da 15 campioni di tessuto FFPE utilizzando il Maxwell® CSC RNA FFPE Kit e il metodo di estrazione standard del laboratorio (metodo di riferimento del laboratorio), quindi amplificato mediante RT-qPCR mirata al gene HPRT1, infine sono stati confrontati i risultati C_q dei due metodi. L'RNA purificato utilizzando il Maxwell® CSC RNA FFPE Kit è risultato amplificato per tutti i campioni e ha fornito valori C_q compresi tra 25,86 e 35,35. Gli eluiti preparati utilizzando il metodo di riferimento del laboratorio non sono riusciti nell'amplificazione di 3 dei 15 campioni testati. I 3 eluiti che non sono risultati amplificati avevano valori C_q più alti rispetto agli eluiti degli stessi campioni preparati con il Maxwell® CSC RNA FFPE Kit.

| Campione di tessuto FFPE | C_q medio | |
|--------------------------|--------------|---------------------------------------|
| | Maxwell® CSC | Metodo di riferimento del laboratorio |
| 1 | 29,55 | 33,78 |
| 2 | 35,35 | C_q nullo |
| 3 | 25,86 | 31,37 |
| 4 | 27,75 | 34,49 |
| 5 | 32,27 | C_q nullo |
| 6 | 33,02 | 34,49 |
| 7 | 32,69 | C_q nullo |
| 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. Riproducibilità

Tabella 5. Riproducibilità tra tester. Per confermare la coerenza dei risultati tra tester diversi nell'ambiente tipico dei tester, l'RNA è stato estratto da otto campioni di tessuto FFPE con due tester separati utilizzando il Maxwell® CSC RNA FFPE Kit e il Maxwell® CSC Instrument. Gli eluiti risultanti sono stati amplificati utilizzando RT-qPCR mirata al gene HPRT1 e i risultati ottenuti da ogni campione sono stati confrontati tra i due tester.

| Campione di tessuto FFPE | C _q medio | |
|--------------------------|----------------------|----------|
| | Tester 1 | Tester 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. Contaminazione crociata

Per confermare che la contaminazione crociata tra i campioni non si verifichi nel tipico ambiente dell'utente, l'RNA è stato purificato da 8 diversi campioni di tessuto FFPE e da 8 campioni di controllo negativo (acqua) utilizzando Maxwell® CSC Instrument e il Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Le cartucce Maxwell® contenenti campioni di tessuto FFPE e le cartucce Maxwell® contenenti il controllo negativo (acqua) sono state elaborate in posizioni dei vassoi alternate sul Maxwell® CSC Instrument. Gli eluiti dei campioni e gli eluiti dei controlli negativi sono stati testati in duplicato mediante RT-qPCR mirata al gene HPRT1 per determinare se si fosse verificata una contaminazione crociata dei campioni negativi. Tutti gli 8 campioni negativi hanno dato risultati negativi, confermando che non si è verificata alcuna contaminazione crociata rilevabile.

10. Risoluzione dei problemi

Per domande non specificamente trattate nel presente manuale, rivolgersi alla filiale o al distributore Promega locale. Le informazioni relative ai contatti sono disponibili all'indirizzo: **www.promega.com**. E-mail: **techserv@promega.com**

| Problema | Cause e commenti |
|---|---|
| Concentrazioni di RNA nell'eluito inferiori alle attese (Una sezione FFPE tipica deve produrre RNA amplificabile in funzione di: dimensioni e cellularità del tessuto, condizioni di fissaggio in formalina e maneggiamento.) | <p>Le prestazioni del kit sono state valutate isolando l'RNA da campioni di tessuto FFPE di dimensioni comprese tra 0,1 mm³ e 2,0 mm³. Usare sezioni che rientrino in questo intervallo.</p> <p>Il kit è stato progettato per l'uso con campioni di tessuto FFPE prelevati da mammella, polmone e colon umani. I tempi e le temperature di incubazione potrebbero non essere ottimali per altri tipi di campioni.</p> <p>Il kit non è stato progettato per l'uso con campioni di tessuto che siano stati preparati con fissativi diversi dalla formalina 10% neutra tamponata. Confermare che non sono stati utilizzati fissativi alternativi.</p> <p>RNasi possono essere state introdotte durante l'elaborazione o la quantizzazione del campione. Vedere la Sezione 11 per informazioni su come creare un ambiente privo di ribonucleasi.</p> <p>Il tessuto utilizzato proveniva da un vetrino o da una sezione macchiati. Nessuna prerogativa è valida per vetrini o sezioni macchiati. Ripetere la purificazione con vetrini o sezioni non macchiati.</p> <p>Le prestazioni del kit sono state valutate sulla base della purificazione di RNA amplificabile. Altri mezzi di quantizzazione, quali l'assorbanza o il legame di colorante fluorescente, possono non correlare con l'amplificazione. Usare una quantizzazione dell'amplificazione per valutare la resa.</p> |

Problema

Cause e commenti

Qualità inferiore alle attese
(L'eluato contiene RNA fortemente frammentato
o inibitori dell'analisi a valle.)

Il fissaggio in formalina e la successiva inversione dei legami frammenteranno l'RNA. Se l'RNA è frammentato prima del processo di purificazione/ estrazione, il kit purificherà RNA frammentato. Ripetere su una sezione adiacente per stabilire se il problema è inerente alla sezione selezionata o al processo.

Alcune analisi basate sull'amplificazione sono particolarmente sensibili alla presenza di inibitori. I controlli delle analisi a valle dovranno identificare la presenza di un inibitore di amplificazione nell'eluato. È responsabilità dell'utente verificare la compatibilità di questo prodotto con tutte le analisi a valle.

Presenza di DNA negli eluati
(Gli eluati sono contaminati da DNA, con possibili interferenze con le analisi a valle.)

Il cocktail di DNasi aggiunto al campione fornisce una attività di DNasi in eccesso quando utilizzato con campioni di tessuto FFPE di dimensioni tra 0,1 mm³ e 2,0 mm³. Non è stato progettato per campioni al di fuori di questi valori e può non essere ottimale. Usare sezioni che rientrino in questo intervallo.

Il mescolamento insufficiente del cocktail di DNasi nel campione durante la pre-elaborazione può comportare l'incompleta degradazione del DNA. Assicurarsi di mescolare accuratamente il cocktail di DNasi nel campione.

Se i componenti del cocktail di DNasi vengono aggiunti singolarmente al campione, assicurarsi di aggiungerli nell'ordine elencato nel passaggio 10 della Sezione 5.A. Assicurarsi inoltre di mescolare accuratamente ciascun componente al momento della sua aggiunta. L'aggiunta di componenti in un ordine differente o il mescolamento incompleto possono disattivare la DNasi.

Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo che ha portato, o potrebbe portare, alla morte o a lesioni gravi di un utente o di un paziente deve essere immediatamente segnalato al fabbricante. Gli utenti con sede nell'Unione Europea devono inoltre segnalare qualsiasi incidente grave all'Autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utente e/o il paziente.

11. Creazione di un ambiente privo di ribonucleasi

È estremamente difficile disattivare le ribonucleasi. Assicurarsi di evitare di introdurre attività RNasiche nei propri campioni di RNA durante e dopo l'isolamento. Ciò è particolarmente importante se il materiale di partenza è disponibile solo in quantità limitate. Le note seguenti possono aiutare ad evitare una contaminazione accidentale dei campioni con RNasi.

1. Due delle più frequenti fonti di contaminazione con RNasi sono le mani dell'utilizzatore e i batteri o le polveri che possono essere presenti in particelle di polvere trasportate dall'aria. Per evitare la contaminazione da tali fonti, utilizzare tecniche di asepsi nel maneggiare i reagenti forniti con questo sistema. Indossare sempre i guanti. Cambiare i guanti ogni volta che si possa aver toccato ribonucleasi.
2. Quando possibile, usare oggetti in plastica usa e getta sterili per maneggiare RNA. Questi materiali sono generalmente privi di RNasi e non richiedono pretrattamenti di disattivazione delle RNasi.
3. Trattare prima dell'utilizzo oggetti in vetro e in plastica non sterili per assicurarsi che siano privi di RNasi. Porre gli oggetti in vetro in forno a 200°C per la notte e sciacquare accuratamente le plastiche con NaOH 0,1 N/EDTA 1 mM, quindi con acqua priva di RNasi. Possono anche essere impiegati prodotti di rimozione delle RNasi commercialmente disponibili, seguendo le istruzioni del fabbricante.
4. Trattare le soluzioni non a corredo del sistema aggiungendo DEPC (dietil pirocarbonato) a 0,1% in una cappa chimica. Incubare tutta la notte agitando a temperatura ambiente nella cappa chimica. Autoclavare per 30 minuti per rimuovere qualunque residuo di DEPC.



Attenzione: DEPC è un possibile cancerogeno e deve essere usato solo in una cappa chimica. DEPC reagisce rapidamente con le amine e non può essere utilizzato per trattare i tamponi Tris.

Nota: per tutte le applicazioni a valle, è essenziale continuare a proteggere i campioni di RNA dalle RNasi.

12. Bibliografia

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

13. Prodotti correlati

Strumento e accessori

| Prodotto | Quantità | Cat.# |
|-------------------------------------|-------------|--------|
| Maxwell® CSC Instrument* | 1 cadauno | AS6000 |
| Maxwell® RSC/CSC Deck Tray | 1 cadauno | SP6019 |
| Maxwell® CSC 48 Instrument* | 1 cadauno | AS8000 |
| Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray | 1 cadauno | AS8401 |
| Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray | 1 cadauno | AS8402 |
| Microtube, 1,5 ml | 1,000/conf. | V1231 |

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

Kit di reagenti Maxwell® CSC

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

14. Riepilogo delle modifiche

Sono state apportate le seguenti modifiche alla revisione del 11/22 di questo documento:

1. La Sezione 3 è stata rinominata Finalità prevista/uso previsto del prodotto.
2. Sono state aggiunte le sezioni 8 e 9.
3. Il documento è stato aggiornato in conformità al Regolamento (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medici diagnostici in vitro.

^(a)Brevetti USA n. 7.329.488 e brevetto Corea n. 10-0483684.

© 2013–2022 Promega Corporation. Tutti i diritti riservati.

Maxwell è un marchio registrato di Promega Corporation.

LpH è un marchio registrato di Steris Corporation.

I prodotti possono essere coperti da brevetti già rilasciati o in corso di rilascio o possono essere soggetti a determinate limitazioni. Per ulteriori informazioni visitare il nostro sito Web.

Specifiche e prezzi sono soggetti a modifica senza preavviso.

Le descrizioni dei prodotti sono soggette a modifica. Per informazioni aggiornate sui prodotti Promega rivolgersi al Promega Technical Services oppure consultare il catalogo Promega online.