

MANUALE TECNICO

Maxwell® CSC RNA Blood Kit

Istruzioni per l'uso del prodotto
AS1410

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
AS1410



Revisione 10/22
TM434

Maxwell[®] CSC RNA Blood 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: preparazione delle soluzioni	6
6. Purificazione di RNA da sangue intero fresco in provette con EDTA	6
6.A. Pre-elaborazione dei campioni di sangue intero	7
6.B. Preparazione della Maxwell [®] CSC RNA Blood Cartridge	7
7. Corsa dello strumento	9
8. Post-purificazione	11
9. Valutazione delle prestazioni analitiche	12
9.A. Quantità e qualità dell'RNA	12
9.B. Amplificabilità dell'RNA	13
9.C. Riproducibilità	13
9.D. Inibizione (sostanze interferenti)	14
9.E. Contaminazione crociata	14
10. Valutazione delle prestazioni cliniche	14
10.A. Quantità, qualità e amplificabilità dell'RNA	15
10.B. Riproducibilità	16
10.C. Contaminazione crociata	16
11. Risoluzione dei problemi	17
12. Creazione di un ambiente privo di ribonucleasi	19
13. Bibliografia	19
14. Prodotti correlati	20
15. Riepilogo delle modifiche	20

Maxwell® CSC RNA Blood Kit è disponibile solo in alcuni paesi.

1. Descrizione

Il Maxwell® CSC RNA Blood Kit^(a) viene usato in combinazione con i Maxwell® Instrument specificati nella Tabella 1 per fornire un metodo semplice per la purificazione efficiente e automatica dell'RNA da sangue umano intero fresco (non congelato) conservato in provette EDTA. 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 60 minuti; l'RNA purificato può essere usato direttamente in applicazioni a valle basate sull'amplificazione, come RT-PCR.

Tabella 1. Strumenti supportati.

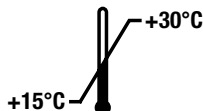
Strumento	Cat. #	Manuale tecnico
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Principio del metodo: Maxwell® CSC RNA Blood Kit purifica l'RNA 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 magnetiche. 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 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 Blood Kit	48 prep	AS1410

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



Include:

- 48 Maxwell® CSC RNA Blood Cartridges
- 4 × 100 ml Soluzione A
- 30 ml Soluzione B
- 20 ml Tampone di lisi
- 2 fiale DNasi I (liofilizzata)
- 900 µl 1-tioglicerolo
- 100 µl Colorante blu
- 2 × 1 ml Soluzione proteinasi K (PK)
- 25 ml Nuclease-Free Water
- 50 Siantuffi CSC/RSC
- 50 Provette di eluizione (0,5 ml)

Condizioni di conservazione: al ricevimento, rimuovere il 1-tioglicerolo e conservarlo a temperature comprese tra +2°C e +10°C. Conservare gli altri componenti del kit a temperatura ambiente (tra +15 e +30°C). Il 1-tioglicerolo può essere conservato a temperatura ambiente (tra +15 e +30°C), dove si mantiene stabile per massimo 9 mesi. Conservare la DNasi reidratata a temperature comprese tra -30°C e -10°C. Non eseguire più di 10 cicli di congelamento-scongelo.



Informazioni sulla sicurezza: le cartucce contengono etanolo, che è infiammabile. Il 1-tioglicerolo è tossico. Il tiocianato di guanidina e l'idrocloruro di guanidina (componenti della soluzione B e del tampone di lisi) sono pericolosi e irritanti. Nel maneggiare queste sostanze, indossare i guanti e attenersi alle procedure di sicurezza standard.



I componenti di Maxwell® CSC RNA Blood Kit sono progettati per essere utilizzati con sostanze potenzialmente infettive. L'utilizzatore è tenuto a indossare dispositivi di protezione individuale (p. es., guanti, un camice da laboratorio e occhiali) durante la manipolazione di sostanze infettive. L'utilizzatore deve attenersi alle linee guida della propria struttura per la gestione e lo smaltimento di tutte le sostanze infettive utilizzate con questo sistema.



Nota: la candeggina reagisce con il cloruro di ammonio e il tiocianato di guanidina producendo vapori tossici. Nella soluzione A e nella soluzione B sono presenti rispettivamente cloruro di ammonio e tiocianato di guanidina. Non decontaminare i rifiuti di questo kit con la candeggina.



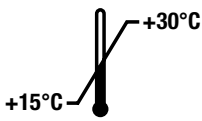








Attenzione: maneggiare le cartucce e aprire la fiala di DNasi liofilizzata con attenzione; i bordi possono essere taglienti.

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

Informazioni aggiuntive: i componenti del Maxwell® CSC RNA Blood 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. Per ulteriori informazioni sulla sicurezza, vedere la scheda di sicurezza (Safety Data Sheet) disponibile all'indirizzo: www.promega.com

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.		Veleno
	Corrosivo		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 Blood Kit è destinato all'uso come dispositivo medico-diagnostico in vitro (IVD) per l'isolamento automatico dell'RNA da 2,5 ml di sangue umano intero conservato in provette di prelievo con EDTA con conta leucocitaria (WBC - White Blood Cell) compresa tra 4×10^6 e 10×10^6 WBC per millilitro, in combinazione con i Maxwell® CSC Instrument e il metodo di purificazione Maxwell® CSC RNA Blood. L'RNA purificato è adatto per l'impiego in analisi diagnostiche in vitro basate sull'amplificazione.

Maxwell® CSC RNA Blood Kit è previsto per l'uso con 2,5 ml di sangue umano intero. Maxwell® CSC RNA Blood Kit è previsto per un impiego ad una temperatura ambiente compresa tra 15°C e 30°C. L'impiego al di fuori di questi valori può comportare risultati non ottimali.

Maxwell® CSC RNA Blood 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

Maxwell® CSC RNA Blood Kit è destinato esclusivamente all'uso con campioni di sangue umano intero conservati in provette EDTA. Non deve essere utilizzato con: campioni di sangue non intero, come il midollo osseo o buffy coat, o campioni conservati in altri tipi di provette.

Maxwell® CSC RNA Blood Kit non deve essere utilizzato con altri tipi di campioni, inclusi campioni non umani, o per la purificazione di DNA.

Le prestazioni di Maxwell® CSC RNA Blood Kit sono state valutate in termini di isolamento di RNA da 2,5 ml di sangue umano intero in provette con EDTA.

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 Blood Kit deve includere idonei controlli.

5. Prima di iniziare: preparazione delle soluzioni

1-tioglicerolo/soluzione B

Preparare una miscela di 1-tioglicerolo/soluzione B con uno dei metodi seguenti:

Aggiungere 600 µl di 1-tioglicerolo al flacone di soluzione B e mescolare accuratamente. Il 1-tioglicerolo è viscoso ed è necessario usare la pipetta con attenzione per una misura accurata. Prima dell'uso, raffreddare la miscela di 1-tioglicerolo/soluzione B su ghiaccio o a 2–10°C.

In alternativa, preparare volumi più piccoli aggiungendo 20 µl di 1-tioglicerolo per millilitro di soluzione B. Preparare 200 µl di 1-tioglicerolo/soluzione B refrigerata per campione.

Nota: conservare la miscela di 1-tioglicerolo/soluzione B a 2–10°C, dove si mantiene stabile fino a 30 giorni.

DNasi I

Aggiungere 275 µl di Nuclease-Free Water alla fiala di DNasi I liofilizzata. Rovesciare la fiala per lavare via dal tappo la DNasi I e girare delicatamente per mescolare; non mescolare con l'agitatore. Aggiungere 25 µl di colorante blu alla DNasi I ricostituita come ausilio visivo per pipettare e preparare la cartuccia. Ciascuna purificazione richiede 10 µl di soluzione preparata di DNasi I. Conservare la DNasi I reidratata tra –30°C e –10°C. Non congelare-scongelerare più di dieci volte la DNasi I ricostituita.



Attenzione: aprire la fiala di DNasi con attenzione; i suoi bordi possono essere taglienti.

6. Purificazione di RNA da sangue intero fresco in provette con EDTA

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 12, Creazione di un ambiente privo di ribonucleasi, per maggiori informazioni.

Fornitura materiali a cura dell'utente

- sangue intero (non congelato) in provette con EDTA; il sangue può essere conservato fino a 3 giorni a 2–10°C prima della purificazione
- microcentrifuga
- pipette sierologiche da 10 ml (sterili)
- pipette e puntali ART privi di RNasi e sterili
- provette da 15 ml (sterili)
- centrifuga con rotore “swinging-bucket” (a cestello oscillante)

6.A. Pre-elaborazione dei campioni di sangue intero

1. Trasferire 2,5 ml di sangue intero ben mescolato (non congelato) dalla provetta con EDTA ad una provetta sterile da 15 ml.
2. Aggiungere 7,5 ml di soluzione A e rovesciare la provetta 5–10 volte per mescolare. Questo è un passaggio di lisi differenziale; gli eritrociti vengono sottoposti a lisi, mentre i leucociti rimangono intatti.
3. Incubare i lisati per 10 minuti a temperatura ambiente. Per mescolare, rovesciare i campioni due volte durante l'incubazione come nel passaggio 2.
4. Centrifugare la provetta (o le provette) a $3.000 \times g$ per 10 minuti in un rotore "swinging-bucket".
5. Eliminare il surnatante per decantazione o tramite pipetta. Centrifugare brevemente la provetta per raccogliere il liquido residuo sul fondo. Tramite una pipetta, rimuovere ed eliminare quanto più surnatante possibile senza spostare il pellet WBC visibile.
6. Aggiungere 200 µl di 1-tioglicerolo/soluzione B refrigerata al pellet e agitare con l'agitatore per rimettere in sospensione il pellet.
7. Aggiungere 200 µl di tampone di lisi e 25 µl di Proteinasi K alla sospensione ricomposta di pellet. Mescolare tramite agitatore per 15–20 secondi.

Nota: se è necessario interrompere la pre-elaborazione, i campioni possono essere conservati dopo il passaggio 7 tra -30°C e -10°C fino a 5 giorni. A queste temperature di conservazione, i campioni possono o meno congelarsi completamente. Quando si è pronti a riprendere la purificazione del campione, scongelare le provette a temperatura ambiente per 10 minuti prima di continuare con il passaggio successivo.

8. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Nel frattempo, preparare le cartucce come descritto nella Sezione 6.B.
9. Aggiungere il lisato alla camera n.1 della cartuccia Maxwell® CSC RNA Blood Cartridge (la camera più ampia della cartuccia).

6.B. Preparazione della Maxwell® CSC RNA Blood Cartridge

1. Cambiare guanti prima di maneggiare Maxwell® CSC RNA Blood 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 quindi 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 CSC/RSC nella camera n.8 di ciascuna cartuccia.

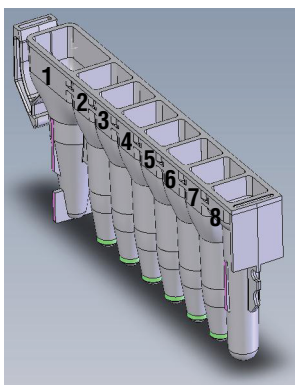
6.B. Preparazione della Maxwell® CSC RNA Blood Cartridge (continua)

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 Blood Kit. Altre provette di eluizione possono non essere compatibili con i 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 Nuclease-Free Water a corredo di Maxwell® CSC RNA Blood Kit. L'utilizzo di altri tamponi di eluizione può interferire con la purificazione dell'RNA o l'impiego a valle.
5. Aggiungere 10 µl di DNasi I ricostituita (blu) alla camera n.4 (gialla) di ciascuna cartuccia. Il conseguente colore verde indica visivamente che la soluzione di DNasi I è stata aggiunta alla camera n.4.

Note sulla preparazione della cartuccia Maxwell® CSC RNA Blood 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. Lisato del campione pre-elaborato
4. 10 µl di DNasi I preparata
8. Stantuffo CSC/RSC

Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge. Il lisato del campione di sangue pre-elaborato viene aggiunto alla camera n.1; 10 µl di DNasi I vengono aggiunti alla camera n.4 e uno stantuffo CSC/RSC viene aggiunto alla camera n.8.



Figura 2. Preparazione e allestimento del vassoio. Nuclease-Free Water (50 µl) viene aggiunta alle provette di eluizione come indicato.

7. Corsa dello strumento

Il Maxwell® CSC RNA Blood Method per il Maxwell® CSC Instrument può essere scaricato dalla pagina Web Promega: www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod. Il Maxwell® CSC RNA Blood Method per il Maxwell® CSC 48 Instrument può essere scaricato dalla pagina Web Promega: www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-csc-48-methods/

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 del rispettivo Maxwell® CSC Instrument.

1. Accendere il 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 "Home".
3. Leggere o digitare il codice a barre nell'angolo in alto a destra dell'etichetta di Maxwell® CSC RNA Blood Kit e toccare **OK** per selezionare automaticamente il metodo da eseguire (Figura 3).

Nota: il codice a barre del metodo di Maxwell® CSC RNA Blood 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.

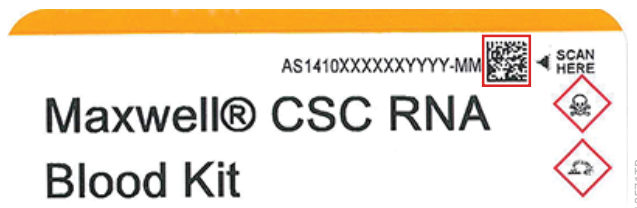


Figura 3. Etichetta del kit con l'indicazione del codice a barre da leggere. Leggere il codice a barre, mostrato nel riquadro rosso sulla parte superiore destra dell'etichetta kit reagente, per avviare un ciclo di purificazione.

7. Corsa dello strumento (continua)

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.

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 segnerà tramite un messaggio 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. I campioni di RNA possono essere conservati per la notte tra -30°C e -10°C o per periodi maggiori a temperature inferiori a -60°C.

Assicurarsi che i campioni vengano rimossi dallo strumento prima di eseguire un protocollo di igienizzazione UV per evitare di danneggiare l'acido nucleico purificato.



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.

8. 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.

9. Valutazione delle prestazioni analitiche

Le prestazioni analitiche di Maxwell® CSC RNA Blood Kit sono state valutate utilizzando campioni di sangue umano intero sul Maxwell® CSC Instrument. Durante lo sviluppo dello strumento sono state dimostrate le prestazioni equivalenti di Maxwell® CSC RNA Blood Kit con il Maxwell® CSC 48 Instrument.

9.A. Quantità e qualità dell'RNA

Tabella 2. RNA estratto da campioni replicati di sangue intero spediti. L'RNA è stato estratto da otto campioni replicati di 2,5 ml di sangue intero spediti e eluiti in 50 µl. L'assorbanza dell'RNA purificato è stata misurata a 230 nm, 260 nm, 280 nm e 340 nm. La concentrazione di RNA è stata determinata tramite assorbanza a 260 nm dopo aver sottratto l'assorbanza del bianco e corretto per tenere conto del rumore prodotto dallo strumento (assorbanza a 340 nm), e sono stati calcolati i rapporti A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} per valutare la qualità dell'RNA. Maxwell® CSC RNA Blood Kit ha prodotto concentrazioni di RNA in media di 127,54 ng/µl con un rapporto medio A_{260}/A_{280} di 2,12 e un rapporto medio A_{260}/A_{230} di 2,10.

Concentrazione di RNA			
Replicato	(ng/µl)	Rapporto A_{260}/A_{280}	Rapporto 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
Media	127,54	2,12	2,10

*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.

9.B. Amplificabilità dell'RNA

Tabella 3. Valutazione dell'amplificabilità dell'RNA utilizzando sangue intero. Per valutare l'amplificabilità dell'RNA estratto da sangue intero utilizzando il Maxwell® CSC RNA Blood Kit e il Maxwell® CSC Instrument, ogni campione di RNA estratto è stato amplificato in duplicato mediante un'analisi della RT-qPCR mirata a un gene costitutivo, HPRT1 (ipoxantina fosforibosiltransferasi 1). Tutti i campioni di RNA sono stati amplificati all'interno dell'intervallo lineare dell'analisi, con rese tra 117,84–182,79 ng/μl e una resa media su tutti i campioni di 151,58 ng/μl.

Campione di RNA	Concentrazione di RNA (ng/μl) determinata mediante 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
Media	151,58

9.C. Riproducibilità

Tabella 4. Variabilità da utente a utente nell'estrazione di RNA da sangue intero. Per determinare la variabilità da utente a utente, l'RNA è stato estratto da campioni di sangue intero da tre utenti diversi utilizzando il Maxwell® CSC RNA Blood Kit e il Maxwell® CSC Instrument. L'RNA estratto è stato amplificato in un'analisi della RT-qPCR mirata al gene HPRT1 e le concentrazioni di RNA sono state calcolate dai valori C_q . Ogni set di campioni comprendeva otto replicati. Il coefficiente di variazione percentuale (% CV) tra i set di campioni dei tre utenti è risultato pari a 9,83.

Utente	Resa media (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, Utenti 1, 2, 3		9,83

*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.

9.D. Inibizione (sostanze interferenti)

Tabella 5. Test per identificare la contaminazione con RNasi e l'inibizione dell'amplificazione dell'RNA a causa di sostanze interferenti. L'RNA è stato estratto da otto campioni replicati dello stesso campione di sangue intero utilizzando il Maxwell® CSC RNA Blood Kit e Maxwell® CSC Instrument. Per verificare la presenza di RNasi attiva negli eluiti è stato utilizzato un test per la rilevazione della RNasi disponibile in commercio. Non è stata rilevata alcuna attività di RNasi. È stato valutato anche l'effetto di sostanze interferenti che vengono purificate in concomitanza con l'RNA del sangue intero. Per ogni eluito di RNA sono stati realizzati due set di amplificazioni, una serie utilizzando 2 µl di RNA non diluito per RT-qPCR mirata al gene HPRT1 e una seconda serie utilizzando 2 µl di una diluizione 1 a 8, e sono poi stati calcolati i valori ΔC_q . L'intervallo dei valori ΔC_q è rientrato tra un minimo di 2,256 e un massimo di 3,116 cicli. Tutti i valori di ΔC_q sono rientrati nell'intervallo di 3 ± 1 cicli previsto per una diluizione 1 a 8, confermando che le sostanze che vengono purificate in concomitanza con l'RNA da sangue intero hanno un effetto minimo sull'amplificazione.

Numero di campioni	C_q dell'RNA non diluito (cicli)	C_q della diluizione 1 a 8 dell'RNA (cicli)	ΔC_q (cicli)
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. Contaminazione crociata

L'RNA è stato estratto da otto replicati di un singolo campione di sangue intero e 8 controlli negativi (acqua) utilizzando il Maxwell® CSC RNA Blood Kit e Maxwell® CSC Instrument. Le Maxwell® CSC Cartridges contenenti campioni di sangue intero e quelle contenenti il controllo negativo (acqua) sono state elaborate in posizioni dei vassoi alternate sul Maxwell® CSC Instrument. Gli eluiti di RNA risultanti sono stati analizzati in duplicato mediante RT-qPCR mirata al gene HPRT1 per rilevare eventuali contaminazioni di RNA nei controlli negativi dai campioni di sangue intero vicini. Non è stato rilevato alcun RNA contaminante nei controlli negativi.

10. Valutazione delle prestazioni cliniche

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

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

Tabella 6. Confronto dei metodi. L'RNA è stato estratto da campioni di 2,5 ml da un totale di 24 campioni distinti di sangue intero utilizzando il Maxwell® CSC RNA Blood Kit e Maxwell® CSC Instrument. L'RNA è stato estratto dagli stessi campioni utilizzando il metodo di purificazione degli acidi nucleici standard del laboratorio (Laboratory Reference Method) a scopo di confronto. L'RNA estratto è stato analizzato mediante RT-qPCR per BCR-ABL1 mirata al trascritto di ABL1 wild type (proto-oncogene 1 ABL) secondo le procedure standard del laboratorio clinico, e la resa è stata determinata in base al numero di copie ABL1 rilevate. Gli eluiti di RNA provenienti dallo stesso campione di sangue intero sono stati analizzati all'interno della stessa analisi della RT-qPCR per minimizzare gli effetti della variabilità delle analisi sui risultati. L'RNA estratto con il Maxwell® CSC RNA Blood Kit ha prodotto ≥ 10.000 copie di ABL1 nell'analisi della RT-qPCR. Le rese ottenute con l'RNA estratto dallo stesso campione di sangue sono risultate concordanti per l'RNA estratto con il Maxwell® CSC RNA Blood Kit e il metodo di riferimento del laboratorio.

Campione di sangue	Resa dell'RNA (copie ABL1)		C _q medio		ΔC_q (Maxwell® CSC–Metodo di riferimento del laboratorio)
	Maxwell® CSC System	Metodo di riferimento del laboratorio	Maxwell® CSC System	Metodo di riferimento 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. Riproducibilità

Tabella 7. Riproducibilità dell'estrazione dell'RNA da parte di tester diversi. Per confermare la coerenza dei risultati tra utenti diversi nell'ambiente tipico degli utenti, l'RNA è stato estratto da otto diversi campioni di sangue intero da due tester separati utilizzando il Maxwell® CSC RNA Blood Kit e il Maxwell® CSC Instrument. Gli eluiti di RNA risultanti sono stati amplificati utilizzando un'analisi della RT-qPCR per BCR-ABL1 mirata al trascritto di ABL1 wild type, e i risultati ottenuti da ogni campione sono stati confrontati tra i due tester. L'RNA estratto da entrambi i tester da tutti i campioni è risultato amplificabile e ha prodotto ≥ 10.000 copie di ABL1, con una differenza media di C_q (ΔC_q) tra i tester inferiore a 1 ciclo. L'intervallo ΔC_q è stato tra 0,03 e 1,25.

Campione di sangue	Resa dell'RNA (copie ABL1)		C_q medio		Intervallo ΔC_q tra i tester
	Tester 1	Tester 2	Tester 1	Tester 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. Contaminazione crociata

È stata valutata la contaminazione crociata tra i campioni durante l'estrazione dell'RNA utilizzando il Maxwell® CSC RNA Blood Kit nell'ambiente tipico dell'utente. L'estrazione dell'RNA con il Maxwell® CSC RNA Blood Kit è stata eseguita con otto diversi campioni di sangue intero e otto controlli negativi (acqua) nello stesso ciclo dello strumento. Le Maxwell® CSC Cartridges contenenti campioni di sangue intero e quelle contenenti i controlli negativi sono state elaborate in posizioni dei vassoi alternate e adiacenti sul Maxwell® CSC Instrument. Gli eluiti risultanti sono stati analizzati in duplicato mediante RT-qPCR mirata al gene ABL1 wild type per determinare se i campioni di controllo negativo contenevano RNA contaminante dai campioni di sangue. Nei controlli negativi non è stato rilevato alcun RNA contaminante, confermando l'assenza di contaminazione crociata rilevabile durante l'estrazione dell'RNA con il sistema Maxwell® CSC.

11. 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 possibili e commenti
Concentrazioni di RNA nell'eluito inferiori alle attese (un campione tipico deve produrre >50 ng/μl di RNA purificato)	<p>La conta leucocitaria WBC del campione di sangue era inferiore o superiore all'intervallo di valori (tra 4×10^6 e 10×10^6 WBC/ml) per cui il prodotto è previsto. Il kit è ottimizzato per purificare RNA dai campioni di sangue con conta WBC da 4×10^6 a 10×10^6 WBC/ml.</p> <p>È stato usato un volume di sangue intero non corretto. L'aggiunta di volumi di sangue intero maggiori o minori di 2,5 ml può generare una resa inferiore.</p> <p>Il campione di sangue era troppo vecchio. I risultati migliori si ottengono con campioni di sangue fresco. Campioni conservati a 2–10°C per più di 3 giorni possono dare rese peggiori.</p> <p>Il campione è stato conservato a meno di 2°C o a più di 10°C prima della purificazione. Temperature di conservazione non corrette possono causare la lisi dei leucociti o la degradazione dell'RNA.</p> <p>RNasi possono essere state introdotte durante l'elaborazione o la quantizzazione del campione. Vedere la Sezione 12 per informazioni su come creare un ambiente privo di ribonucleasi.</p> <p>Rimozione inadeguata del surnatante dopo la lisi differenziale. Assicurarsi che il surnatante sia eliminato al meglio.</p> <p>Il pellet WBC è stato spostato durante la rimozione del surnatante. Evitare di toccare il pellet WBC nel rimuovere il surnatante.</p> <p>Tipo di campione non corretto. Il kit è inteso per l'uso con sangue umano intero. Il kit non è stato testato su altri tipi di campione (p. es., midollo osseo, plasma, buffy coat, ecc).</p> <p>Tipo di provetta di prelievo del sangue non corretto. Il kit è inteso per l'uso con sangue umano intero in provette con EDTA. Questo kit non è stato testato con altri tipi di provette che possono non essere compatibili con la chimica della purificazione.</p>

11. Risoluzione dei problemi (continua)

Problema	Cause possibili e commenti
RNA di scarsa qualità (gli eluiti devono avere un rapporto A_{260}/A_{280} maggiore di 1,8 e un rapporto A_{260}/A_{230} tra 1,8 e 2,4)	<p>La conta leucocitaria WBC del campione di sangue era superiore all'intervallo di valori (tra 4×10^6 e 10×10^6 WBC/ml) per cui il prodotto è previsto. Il kit è ottimizzato per purificare RNA dai campioni di sangue con conta WBC da 4×10^6 a 10×10^6 WBC/ml.</p> <p>È stato usato un volume di sangue intero non corretto. L'aggiunta di volumi di sangue intero maggiori di 2,5 ml può generare una scarsa purezza dell'eluito.</p> <p>Il campione di sangue era troppo vecchio. I risultati migliori si ottengono con campioni di sangue fresco. Campioni conservati a 2°C–10°C per più di 3 giorni possono dare RNA di qualità scarsa.</p> <p>Il campione è stato conservato a meno di 2°C o a più di 10°C prima della purificazione. Temperature di conservazione non corrette possono causare la lisi dei leucociti o la degradazione dell'RNA.</p> <p>Rimozione inadeguata del surnatante dopo la lisi differenziale. Assicurarsi che il surnatante sia eliminato al meglio.</p> <p>Tipo di campione non corretto. Il prodotto è inteso per l'uso con sangue umano intero. Il prodotto non è stato testato su altri tipi di campione (p. es., midollo osseo, plasma, buffy coat, ecc).</p>
Alti livelli di DNA sono presenti negli eluiti (gli eluiti sono contaminati con DNA, che può interferire con le analisi a valle)	<p>La conta leucocitaria WBC del campione di sangue era superiore all'intervallo di valori (tra 4×10^6 e 10×10^6 WBC/ml) per cui il prodotto è previsto.</p> <p>È stato usato un volume di sangue intero non corretto. L'aggiunta di volumi di sangue superiori a 2,5 ml può contaminare gli eluiti con DNA.</p> <p>Non è stata aggiunta alla cartuccia DNasi I. Se possibile, esaminare la camera n.4 nelle cartucce usate. La camera n.4 dovrà risultare verde (non gialla) se era stata aggiunta DNasi I alle cartucce nel passaggio 5 della Sezione 6.B.</p>
Il lisato pre-elaborato è troppo viscoso per essere prelevato con la pipetta	<p>La conta leucocitaria WBC del campione di sangue era superiore all'intervallo di valori (da 4×10^6 a 10×10^6 WBC/ml) per cui il prodotto è previsto.</p> <p>È stato usato un volume di sangue intero non corretto. L'aggiunta di volumi di sangue superiori a 2,5 ml può determinare lisati viscosi e difficili da prelevare.</p>

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.

12. Creazione di un ambiente privo di ribonucleasi

È estremamente difficile disattivare le ribonucleasi. Assicurarsi di evitare di introdurre attività RNasi nei propri campioni di RNA durante e dopo l'isolamento. Ciò è particolarmente importante se il materiale di partenza è stato difficile da ottenere o non è reintegrabile. 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 muffe che possono essere presenti in particelle di polvere trasportate dall'aria. Per evitare la contaminazione da tali fonti, utilizzare tecniche sterili 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 e camere di elettroforesi 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.

Nota: le camere di elettroforesi possono essere contaminate con ribonucleasi (in particolare con RNasi A) originate dai campioni di DNA. Quando possibile, dedicare un apparato nuovo o decontaminato alla sola analisi dell'RNA.

4. Trattare le soluzioni non a corredo del sistema aggiungendo DEPC (dietil pirocarbonato) a 0,1% v/v 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. Indossare guanti puliti e usare soluzioni e provette da centrifuga prive di RNasi.

13. Bibliografia

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

14. 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.

15. Riepilogo delle modifiche

Sono state apportate le seguenti modifiche alla revisione del 10/22 di questo documento:

1. La Sezione 3 è stata rinominata in Finalità prevista/uso previsto del prodotto.
2. Sono state aggiunte le Sezioni 9 e 10 e rinumerate le sezioni seguenti.
3. Documento aggiornato in conformità al Regolamento (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medici diagnostici in vitro.

^(a)Brevetti USA n. 7.329.488 e Sud Corea n. 100483684.

© 2014–2022 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.