

MANUAL TÉCNICO

Maxwell[®] CSC RNA Blood Kit

Instruções de utilização do produto
AS1410

Atenção: manuseie os cartuchos com cuidado; as extremidades do selo podem ser cortantes.

Maxwell[®] CSC RNA Blood Kit

Toda a literatura técnica está disponível na Internet em: www.promega.com/protocols/
 Visite o Website para verificar se está a utilizar a versão mais atual deste Manual técnico.
 Se tiver quaisquer dúvidas sobre a utilização deste sistema, envie um e-mail para o nosso centro de assistência,
 Promega Technical Services: techserv@promega.com

1. Descrição	2
2. Componentes do produto, condições de armazenamento e legenda dos símbolos.....	3
3. Finalidade prevista/Utilização prevista do produto	5
4. Limitações de utilização do produto.....	5
5. Antes de começar: preparação das soluções.....	6
6. Purificação de RNA a partir de sangue total fresco em tubos para recolha EDTA.....	6
6.A. Pré-processamento de amostras de sangue total	7
6.B. Preparação dos Maxwell [®] CSC RNA Blood Cartridges	7
7. Execução do instrumento.....	9
8. Pós-purificação	12
9. Avaliação do desempenho analítico.....	12
9.A. Quantidade e qualidade de RNA	12
9.B. Amplificabilidade de RNA	13
9.C. Reprodutibilidade	13
9.D. Inibição (Substâncias interferentes).....	14
9.E. Contaminação cruzada	14
10. Avaliação do desempenho clínico.....	14
10.A. Quantidade, qualidade e amplificabilidade de RNA.....	15
10.B. Reprodutibilidade.....	16
10.C. Contaminação cruzada	16
11. Resolução de Problemas	17
12. Criação de um ambiente livre de ribonucleases	19
13. Bibliografia.....	20
14. Produtos Relacionados	20
15. Resumo das alterações.....	20



O Maxwell® CSC RNA Blood Kit está disponível apenas em alguns países.

1. Descrição

O Maxwell® CSC RNA Blood Kit^(a) é utilizado em conjunto com o Maxwell® Instruments especificados na Tabela 1 para proporcionar um método fácil para a purificação automática e eficiente de RNA a partir de sangue total humano fresco (não congelado) recolhido em tubos de EDTA. O Maxwell® CSC Instruments são concebidos para serem utilizados com cartuchos de reagentes pré-dispensados e reagentes adicionais fornecidos com o kit com métodos de purificação pré-programados, proporcionando assim uma maior simplicidade e comodidade. Os Maxwell® CSC Instruments permitem processar de uma até ao máximo de amostras permitido em aproximadamente 60 minutos e o RNA purificado pode ser utilizado diretamente em diversas aplicações a jusante com base na amplificação, como RT-PCR.

Tabela 1. Instrumentos suportados.

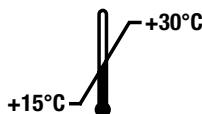
Instrumento	Cat. #	Manual técnico
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Princípio do Método: o Maxwell® CSC RNA Blood Kit purifica o RNA, utilizando partículas paramagnéticas, que fornecem uma fase sólida móvel para otimizar a captura, a lavagem e a purificação de amostras de RNA. Os Maxwell® CSC Instruments são instrumentos de manuseamento de partículas magnéticas. Este sistema permite a ligação eficiente do RNA às partículas paramagnéticas no primeiro poço de um cartucho pré-cheio e move a amostra ao longo dos poços do cartucho. Esta abordagem à captura magnética evita problemas comuns associados aos sistemas de manuseamento de líquidos, como pontas entupidas ou transferências de reagentes parciais, que resultam no processamento subótimo da purificação por outros sistemas normalmente utilizados.

2. Componentes do produto, condições de armazenamento e legenda dos símbolos

PRODUTO	TAMANHO	CAT.#
Maxwell® CSC RNA Blood Kit	48 preparações	AS1410





Para utilização em diagnóstico in vitro. Apenas para utilização profissional. Quantidade suficiente para 48 isolamentos automáticos a partir de amostras de sangue. Os Maxwell® CSC Cartridges destinam-se apenas a uma única utilização.



Inclui:

- 48 Maxwell® CSC RNA Blood Cartridges
- 4 × 100 ml Solução A
- 30 ml Solução B
- 20 ml Tampão de lise
- 2 frascos DNase I (liofilizada)
- 900 µl 1-tioglicerol
- 100 µl Corante azul
- 2 × 1 ml Solução de proteinase K (PK)
- 25 ml Nuclease-Free Water
- 50 Êmbolos CSC/RSC
- 50 Tubos de eluição (0,5 ml)



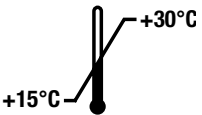













Condições de armazenamento: após a recepção, remova o 1-tioglicerol e armazene-o entre +2 °C a +10 °C. Armazene os restantes componentes do kit à temperatura ambiente (+15 °C a +30 °C). O 1-tioglicerol pode ser armazenado à temperatura ambiente (+15 °C a +30 °C), onde se mantém estável até 9 meses. Armazene o DNase I reidratado a -30 °C a -10 °C. Não exceda 10 ciclos de congelação-descongelação.

- 
Informações de segurança: os cartuchos contêm etanol, o qual é inflamável. O 1-tioglicerol é tóxico. O tiocianato de guanidina e o hidrocloreto de guanidina (componentes da solução B e do tampão de lise) são substâncias nocivas e irritantes. Quando trabalhar com estas substâncias, use sempre luvas e siga os procedimentos de segurança padrão.
- 
 Os componentes do Maxwell® CSC RNA Blood Kit são concebidos para serem utilizados com substâncias potencialmente infecciosas. Os utilizadores têm de usar equipamento de proteção individual adequado (por exemplo, luvas, bata de laboratório e óculos de proteção) durante o manuseamento de substâncias infecciosas. Devem igualmente cumprir as diretrizes institucionais relativas ao manuseamento e à eliminação de todas as substâncias infecciosas utilizadas com este sistema.
- 
Nota: a lixívia reage com cloreto de amónio e tiocianato de guanidina, produzindo fumos tóxicos. O cloreto de amónio e o tiocianato de guanidina estão presentes na Solução A e B, respetivamente. Não efetue a descontaminação dos resíduos deste kit com lixívia.
- 
Atenção: manuseie os cartuchos e abra o frasco de DNase I liofilizada com cuidado; as extremidades podem ser cortantes.

2. Componentes do produto, condições de armazenamento e legenda dos símbolos (continuação)

Informações adicionais: os componentes do Maxwell[®] CSC RNA Blood Kit são qualificados e testados de acordo com o controlo de qualidade para trabalharem em conjunto. Não é recomendado misturar componentes de kits com lotes de kits diferentes. Utilize apenas os componentes fornecidos no kit. Não utilize os cartuchos se o selo no cartucho não estiver intacto no momento da receção. Para obter informações de segurança adicionais, consulte a Ficha de dados de segurança, disponível em: www.promega.com

Legenda dos símbolos

Símbolo	Explicação	Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro		Representante autorizado
	Conservar a +15 °C a +30 °C.		Fabricante
	Atenção		Irritante
	Risco de saúde.		Veneroso
	Corrosivo		Conteúdo suficiente para "n" testes
	Conformidade Europeia		Aviso. Riscos biológicos.
	Aviso. Perigo de entalamento.		Número de catálogo
	Número de lote		Não reutilizar

3. Finalidade prevista/Utilização prevista do produto

O Maxwell® CSC RNA Blood Kit destina-se a ser utilizado, em conjunto com os Maxwell® CSC Instruments e com o método de purificação Maxwell® CSC RNA Blood, como um dispositivo médico para diagnóstico in vitro (IVD) para a realização do isolamento automático de RNA a partir de 2,5 ml de sangue total humano recolhido em tubos para recolha EDTA com uma contagem de glóbulos brancos (WBC) entre 4×10^6 a 10×10^6 WBC por mililitro.

O RNA purificado é adequado para utilização em ensaios de diagnóstico in vitro com base na amplificação.

O Maxwell® CSC RNA Blood Kit destina-se a ser utilizado com 2,5 ml de total sangue humano.

O Maxwell® CSC RNA Blood Kit destina-se a ser utilizado a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C. A utilização fora deste intervalo de temperatura pode dar origem a resultados subótimos.

O Maxwell® CSC RNA Blood Kit destina-se exclusivamente a utilização profissional. Os resultados do diagnóstico obtidos através da utilização de RNA purificado com este sistema devem ser interpretados em conjunto com outros dados clínicos ou laboratoriais.

4. Limitações de utilização do produto

O Maxwell® CSC RNA Blood Kit destina-se a ser utilizado apenas com amostras de total sangue humano recolhidas em tubos de EDTA. Este não se destina a ser utilizado com amostras de sangue não total, como medula óssea ou camada leuco-plaquetária, ou amostras armazenadas noutros tubos para recolha.

O Maxwell® CSC RNA Blood Kit não se destina a ser utilizado com amostras não humanas nem para a purificação de DNA.

O desempenho do Maxwell® CSC RNA Blood Kit foi avaliado quanto ao isolamento de RNA a partir de 2,5 ml de sangue total humano em tubos para recolha EDTA.

O utilizador é responsável pelo estabelecimento das características de desempenho necessárias às aplicações de diagnóstico a jusante. Devem ser incluídos controlos adequados em todas as aplicações de diagnóstico a jusante que utilizem RNA purificado com o Maxwell® CSC RNA Blood Kit.

5. Antes de começar: preparação das soluções

1-tioglicerol/solução B

Prepare uma mistura de 1-tioglicerol/solução B, utilizando um dos métodos seguintes:

Adicione 600 µl de 1-tioglicerol à garrafa de solução B e misture bem. O 1-tioglicerol é viscoso, pelo que é necessária uma pipetagem cuidadosa para uma medição precisa. Antes de utilizar, refrigere a mistura de 1-tioglicerol/solução B em gelo ou entre 2–10 °C.

Em alternativa, prepare volumes mais pequenos, adicionando 20 µl de 1-tioglicerol por mililitro de solução B. Prepare 200 µl de 1-tioglicerol/solução B refrigerada por amostra.

Nota: armazene a mistura de 1-tioglicerol/solução B preparada entre 2–10 °C, onde se mantém estável até 30 dias.

DNase I

Adicione 275 µl de Nuclease-Free Water ao frasco de DNase I liofilizada. Inverta para soltar a DNase I da parte inferior da tampa e agite suavemente para misturar; não agite por rotação. Adicione 25 µl de corante azul à DNase I reconstituída como um auxiliar visual para a pipetagem e a preparação dos cartuchos. Cada purificação requer 10 µl de solução DNase I preparada. Armazene a DNase I reconstituída entre –30 °C a –10 °C. Não congele/descongele a DNase I reconstituída mais do que dez vezes.



Atenção: abra o frasco de DNase I com cuidado; as extremidades do frasco podem ser cortantes.

6. Purificação de RNA a partir de sangue total fresco em tubos para recolha EDTA

Mantenha o ambiente livre de RNases durante o processamento. Utilize sempre pontas de pipeta livres de RNases e resistentes a aerossóis. Troque de luvas frequentemente de forma a reduzir a possibilidade de contaminação por RNase. Consulte a Secção 12, Criação de um ambiente livre de ribonucleases, para obter informações detalhadas.

Materiais que devem ser fornecidos pelo utilizador

- sangue total em tubos para recolha EDTA (não congelado); o sangue pode ser armazenado até 3 dias entre 2–10 °C antes da purificação
- microcentrifugadora
- pipetas serológicas de 10 ml (esterilizadas)
- pipetadores e pontas de pipeta resistentes a aerossóis, esterilizadas e livres de RNases
- tubos de 15 ml (esterilizados)
- centrifugadora com rotor oscilante

6.A. Pré-processamento de amostras de sangue total

1. Transfira 2,5 ml de sangue total bem misturado (não congelado) a partir do tubo para recolha EDTA para um tubo de 15 ml esterilizado.
2. Adicione 7,5 ml de solução A e inverta o tubo 5–10 vezes para misturar. Trata-se de um passo de lise diferencial; os glóbulos vermelhos são lisados, deixando os glóbulos brancos intactos.
3. Incube os lisatos durante 10 minutos à temperatura ambiente. Inverta as amostras, conforme indicado no Passo 2, para misturar, duas vezes durante a incubação.
4. Centrifugue o(s) tubo(s) a $3.000 \times g$ durante 10 minutos num rotor oscilante.
5. Remova o sobrenadante através de decantação ou de pipetagem. Gire o tubo durante breves instantes para recolher o líquido residual no fundo do tubo. Utilizando uma pipeta, remova e elimine tanto quanto possível de sobrenadante restante sem perturbar o precipitado de WBC visível.
6. Adicione 200 μ l de 1-tioglicerol/solução B refrigerada ao precipitado e agite por rotação para ressuspender o precipitado.
7. Adicione 200 μ l de tampão de lise e 25 μ l de proteinase K ao precipitado ressuspendido. Misture por rotação durante 15–20 segundos.

Nota: se precisar de parar durante o pré-processamento, as amostras podem ser armazenadas após o Passo 7 entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ até 5 dias. A estas temperaturas de armazenamento, as amostras podem ou não congelar completamente. Quando estiver pronto para retomar a purificação das amostras, descongele os tubos à temperatura ambiente durante 10 minutos antes de avançar para o passo seguinte.

8. Incube à temperatura ambiente durante 10 minutos. Durante este tempo, prepare os cartuchos conforme descrito na Secção 6.B.
9. Adicione lisato ao poço n.º 1 do Maxwell[®] CSC RNA Blood Cartridge (o poço maior do cartucho).

6.B. Preparação dos Maxwell[®] CSC RNA Blood Cartridges

1. Troque de luvas antes de manusear os Maxwell[®] CSC RNA Blood Cartridges, os êmbolos CSC/RSC e os tubos de eluição. Os cartuchos estão instalados nos tabuleiros da plataforma fora do instrumento e o tabuleiro da plataforma que contém os cartuchos e as amostras são, de seguida, transferidos para o instrumento para purificação. Coloque cada um dos cartuchos no tabuleiro da plataforma com o poço n.º 1 (o poço maior do cartucho) o mais afastado possível dos tubos de eluição (Figura 2). Pressione para baixo o cartucho de forma a encaixá-lo na respetiva posição. Certifique-se de que ambas as extremidades do cartucho estão totalmente encaixadas no tabuleiro da plataforma. Remova cuidadosamente o selo de forma a retirar a totalidade do selo da parte superior do cartucho. Certifique-se de que remove a totalidade da película aderente vedante e eventuais resíduos de adesivo do cartucho.



Atenção: manuseie os cartuchos com cuidado; as extremidades do selo podem ser cortantes.

2. Coloque um êmbolo CSC/RSC no poço n.º 8 de cada cartucho.

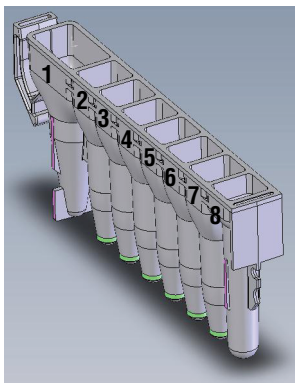
6.B. Preparação dos Maxwell® CSC RNA Blood Cartridges (continuação)

3. Coloque um tubo de eluição vazio na posição do tubo de eluição para cada cartucho nos tabuleiros da plataforma.
Nota: utilize apenas os tubos de eluição fornecidos no Maxwell® CSC RNA Blood Kit. Outros tubos de eluição podem não ser compatíveis com o Maxwell® CSC Instruments e podem afetar o desempenho de purificação de RNA.
4. Adicione 50 µl de Nuclease-Free Water ao fundo de cada tubo de eluição. Os tubos de eluição devem permanecer abertos durante a purificação de RNA.
Nota: utilize apenas a Nuclease-Free Water fornecida no Maxwell® CSC RNA Blood Kit. A utilização de outros tampões de eluição pode afetar o desempenho de purificação de RNA ou a utilização a jusante.
5. Adicione 10 µl de DNase I reconstituída (azul) ao poço n.º 4 (amarelo) de cada cartucho. A cor verde resultante é um indicador visual de que a solução DNase I foi adicionada ao poço n.º 4.

Notas de preparação dos Maxwell® CSC RNA Blood Cartridges



Os pingos de reagente ou de amostra retidos em qualquer parte do tabuleiro da plataforma deverão ser limpos com uma solução de água e detergente, seguida de um spray ou toalhete bactericida e, em seguida, água. Não utilize lixívia em nenhum componente do instrumento.



Adições do utilizador ao conteúdo do poço:

1. Lisato da amostra pré-processado
4. 10 µl de DNase I preparada
8. Êmbolo CSC/RSC

Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge. O lisato da amostra de sangue pré-processado é adicionado ao poço n.º 1, 10 µl de DNase I são adicionados ao poço n.º 4 e um êmbolo CSC/RSC é adicionado ao poço n.º 8.



Figura 2. Instalação e configuração do tabuleiro de plataforma. A Nuclease-Free Water (50 µl) é adicionada aos tubos de eluição, conforme apresentado.

7. Execução do instrumento

O Maxwell® CSC RNA Blood Method para o Maxwell® CSC Instrument pode ser transferido do website da Promega: www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod. O Maxwell® CSC RNA Blood Method para o Maxwell® CSC 48 Instrument pode ser transferido do website da Promega: www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-csc-48-methods/

Se suspeitar que o instrumento pode estar contaminado com RNase, limpe o instrumento antes de o colocar em execução, utilizando uma solução detergente, como Steris LpH®. Siga as instruções na secção Limpeza e manutenção do Manual de funcionamento do Manual de Funcionamento Maxwell® CSC Instrument.

1. Ligue o Maxwell® Instrument e o Tablet PC. Acesse ao Tablet PC e inicie o software Maxwell® IVD-mode tocando duas vezes no ícone no ambiente de trabalho. O instrumento executa uma auto-verificação e coloca todas as peças móveis na respetiva posição inicial.
2. Toque em **Iniciar** no ecrã Página Inicial.
3. Digitalize ou introduza o código de barras do canto superior direito da etiqueta do Maxwell® CSC RNA Blood Kit e toque em **OK** para selecionar automaticamente o método a executar (Figura 3).

Nota: o código de barras do método do Maxwell® CSC RNA Blood Kit é necessário para a purificação de RNA no Maxwell® CSC Instrument. A etiqueta do kit contém dois códigos de barras. O código de barras do método é indicado na Figura 3. Contacte o nosso centro de assistência, Promega Technical Services, p caso o código de barras não possa ser digitalizado.

7. Execução do instrumento (continuação)

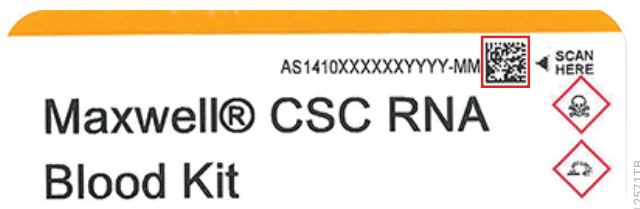


Figura 3. Etiqueta do kit que indica o código de barras a digitalizar. Digitalize o código de barras, exibido na caixa vermelha, no canto superior direito da etiqueta do kit, para iniciar a execução de purificação.

- No ecrã de "Configuração do cartucho", toque nas posições do cartucho para selecionar ou anular a seleção de qualquer posição a utilizar para a execução da extração. Introduza qualquer informação de acompanhamento de amostra e toque no botão **Prosseguir** para continuar.

Nota: quando estiver a usar o Maxwell® CSC 48 Instrument, toque no botão **Anterior** ou **Posterior** para marcar ou desmarcar as posições dos cartuchos em cada tabuleiro de plataforma.

- Após abrir a porta, confirme que todos os itens da lista de verificação de extração foram realizados. Verifique se as amostras pré-processadas foram adicionadas ao poço n.º 1 dos cartuchos, se os cartuchos estão carregados no instrumento, se os tubos de eluição destapados estão presentes com tampão de eluição e se os êmbolos estão colocados no poço n.º 8. Transfira o tabuleiro da plataforma que contém os cartuchos preparados para a plataforma do Maxwell® instrument.

Inserir o tabuleiro da plataforma Maxwell®: segure o tabuleiro da plataforma de ambos os lados para evitar que os cartuchos saiam dos respetivos encaixes no tabuleiro da plataforma. Certifique-se de que o tabuleiro da plataforma é colocado no Maxwell® instrument com os tubos de eluição próximos da porta. Posicione o ângulo da parte posterior do tabuleiro da plataforma para baixo e coloque no instrumento de maneira a que a parte posterior do tabuleiro da plataforma fique apoiada na parte posterior da plataforma do instrumento. Pressione a parte dianteira do tabuleiro da plataforma para baixo para assentar o tabuleiro da plataforma na plataforma de instrumentos. Se tiver dificuldade em encaixar o tabuleiro da plataforma na plataforma, verifique se o tabuleiro da plataforma está na orientação correta. Assegure-se de que o tabuleiro da plataforma se encontra nivelado com a plataforma de instrumentos e totalmente assente.

Nota: verifique o identificador nas bandejas de convés Maxwell® de 24 posições para determinar se devem ser colocadas na frente ou atrás do instrumento.

6. Confirme se todos os pré-processamentos indicados foram realizados e toque em **Iniciar** para fechar a porta do instrumento e iniciar o processamento.

Nota: ao utilizar o Maxwell[®] Instrument de 48 posições, se o Sistema de Visão tiver sido ativado, os tabuleiros da plataforma serão digitalizados à medida que a porta se retrai. Quaisquer erros na configuração do tabuleiro de plataforma (por exemplo, êmbolos não presentes no poço n.º 8, tubos de eluição não presentes e abertos) irão causar o software regressar ao ecrã "Configuração do cartucho" e as posições problemáticas serão marcadas com um ponto de exclamação num círculo vermelho. Toque no ponto de exclamação para obter uma descrição do erro e resolver todos os estados de erro. Toque no botão **Iniciar** novamente para repetir a digitalização do tabuleiro da plataforma e iniciar a extração.



Aviso: perigo de entalamento.

7. O Maxwell[®] Instrument irá iniciar imediatamente a execução de purificação. O ecrã irá apresentar os passos realizados e o tempo aproximado restante na execução.

Notas:

1. Tocar no botão **Abortar** irá abandonar a execução. Todas as amostras de uma execução abortada serão perdidas.
 2. Se a execução for abandonada antes da conclusão, poderá ser-lhe pedido para verificar se os êmbolos ainda estão carregados na barra do êmbolo. Se os êmbolos estão presentes na barra do êmbolo, deve desempenhar uma **Limpeza** quando pedido. Se os êmbolos não estão presentes na barra do êmbolo, pode escolher saltar a **Limpeza** quando pedido. As amostras serão perdidas.
8. Uma vez concluída a execução, a interface do utilizador irá apresentar uma mensagem que indica que o método terminou.

Fim da execução

9. Siga as instruções apresentadas no ecrã no final do método para abrir a porta. Verifique se os êmbolos se encontram no poço n.º 8 do cartucho, no final da execução. Se os êmbolos não forem removidos da barra de êmbolo, siga as instruções do Manual de funcionamento adequadas ao seu Maxwell[®] Instrument (ver Tabela 1) para desempenhar um processo de **Limpeza** para tentar descarregar os êmbolos.
10. Tape e remova os tubos de eluição que contêm RNA imediatamente a seguir à execução para evitar a evaporação dos eluatos. Remova o tabuleiro de plataforma Maxwell[®] do instrumento.

Nota: para remover o tabuleiro da plataforma do instrumento, segure em ambos os lados do tabuleiro da plataforma. As amostras de RNA podem ser armazenadas de um dia para o outro entre -30 °C a -10 °C ou a uma temperatura inferior a -60 °C para um tempo de armazenamento superior.

Certifique-se de que as amostras foram removidas do instrumento antes de executar o protocolo de desinfeção UV, para evitar danificar o ácido nucleico purificado.



11. Remova os cartuchos e os êmbolos do Maxwell[®] Deck Tray e elimine os resíduos perigosos de acordo com os procedimentos da sua instituição. Os cartuchos, os êmbolos e os tubos de eluição destinam-se apenas a uma única utilização. Não reutilize os Maxwell[®] CSC Cartridges, os êmbolos CSC/RSC ou os tubos de eluição.

8. Pós-purificação

Determine se a colheita e a pureza da amostra de RNA purificado correspondem aos requisitos de introdução do ensaio de diagnóstico a jusante antes da utilização nesse ensaio.

9. Avaliação do desempenho analítico

O desempenho analítico do Maxwell® CSC RNA Blood Kit foi avaliado utilizando amostras de sangue total humano no Maxwell® CSC Instrument. O desempenho equivalente do Maxwell® CSC RNA Blood Kit com o Maxwell® CSC 48 Instrument foi demonstrado como parte do desenvolvimento do instrumento.

9.A. Quantidade e qualidade de RNA

Tabela 2. RNA extraído de replicados de amostras de sangue total enviado. O RNA foi extraído de oito replicados de amostras de 2,5 ml de sangue total enviado e eluído em 50 µl. A absorvância do RNA purificado foi medida a 230 nm, 260 nm, 280 nm e 340 nm. A concentração de RNA foi determinada utilizando a absorvância a 260 nm após a subtração da absorvância do controle em branco e da correção para o ruído do instrumento (absorvância a 340 nm) e os raios de A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} foram calculados para avaliar a qualidade de RNA. O Maxwell® CSC RNA Blood Kit obteve concentrações de RNA médias de 127,54 ng/µl, com um rácio de A_{260}/A_{280} médio de 2,12 e um rácio de A_{260}/A_{230} médio de 2,10.

Replicado	Concentração de RNA (ng/µl)	Rácio de A_{260}/A_{280}	Rácio de A_{260}/A_{230}
1	118,22	2,11	2,01*
2	137,85	2,12	2,08
3	107,23	2,12	2,09
4	133,07	2,12	2,09
5	137,18	2,12	2,11
6	93,90	2,12	2,09
7	145,42	2,13	2,12
8	147,45	2,13	2,12
Média	127,54	2,12	2,10

*O teste de Dixon admitiu a exclusão de um replicado neste conjunto como *outlier* com base no limite de confiança de 95%. Este replicado foi excluído da análise.

9.B. Amplificabilidade de RNA

Tabela 3. Avaliar a amplificabilidade de RNA do sangue total. Para avaliar a amplificabilidade de RNA extraído do sangue total utilizando o Maxwell® CSC RNA Blood Kit e o Maxwell® CSC Instrument, cada amostra de RNA extraída foi amplificada em duplicado utilizando um ensaio de RT-qPCR destinado a um gene de referência, HPRT1 (Hipoxantina fosforibosiltransferase 1). Todas as amostras de RNA amplificadas dentro do intervalo linear do ensaio, com colheitas entre 117,84–182,79 ng/μl e uma colheita média em todas as amostras de 151,58 ng/μl.

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

9.C. Reprodutibilidade

Tabela 4. Variabilidade entre utilizadores na extração de RNA do sangue total. Para avaliar a variabilidade entre utilizadores, foi extraído RNA de amostras de sangue total por três utilizadores diferentes utilizando o Maxwell® CSC RNA Blood Kit e o Maxwell® CSC Instrument. O RNA extraído foi amplificado num ensaio de RT-qPCR destinado ao gene HPRT1 e as concentrações de RNA foram calculadas a partir dos valores de C_q . Cada conjunto de amostras continha oito replicados. O coeficiente de variação percentual (% CV) nos conjuntos de amostras dos três utilizadores foi de 9,83.

Utilizador	Colheita média (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, Utilizadores 1, 2, 3		9,83

*O teste de Dixon admitiu a exclusão de um replicado neste conjunto como *outlier* com base no limite de confiança de 95%. Este replicado foi excluído da análise.

9.D. Inibição (Substâncias interferentes)

Tabela 5. Teste de contaminação por RNase e inibição da amplificação de RNA devido a substâncias interferentes. Foi extraído RNA de oito replicados de amostras da mesma amostra de sangue total utilizando o Maxwell® CSC RNA Blood Kit e o Maxwell® CSC Instrument. Foi utilizado um ensaio de detecção de RNase comercialmente disponível para testar a presença de RNase ativa nos eluatos. Não foi observada atividade de RNase detetável. Foi também testado o efeito de substâncias interferentes de copurificação com RNA do sangue total. Foram reunidos dois conjuntos de amplificações para cada eluato de RNA — um utilizando 2 µl de RNA sem diluição de acordo com o RT-qPCR destinado ao HPRT1 e um segundo conjunto utilizando 2 µl de uma diluição por oito — e os valores de ΔC_q foram calculados. Os valores de ΔC_q variaram entre um valor baixo de 2,256 ciclos e um valor elevado de 3,116 ciclos. Todos os valores de ΔC_q estavam incluídos no intervalo de 3 ± 1 ciclos esperado para uma diluição por oito, confirmando que quaisquer substâncias de copurificação com RNA do sangue total tiveram um efeito mínimo na amplificação.

Número da amostra	C_q para RNA sem diluição (Ciclos)	C_q para diluição por oito de RNA (Ciclos)	ΔC_q (Ciclos)
1	25,528	27,881	2,353
2	23,530	26,647	3,116
3	23,836	26,888	3,052
4	23,602	26,618	3,016
5	24,139	26,407	2,268
6	23,567	25,824	2,256
7	23,694	26,469	2,774
8	24,298	27,189	2,891

9.E. Contaminação cruzada

Foi extraído RNA de 8 replicados da mesma amostra de sangue total e 8 controlos negativos (água) utilizando o Maxwell® CSC RNA Blood Kit e o Maxwell® CSC Instrument. Maxwell® CSC Cartridges contendo amostras de sangue total ou controlo negativo (água) foram processados em posições alternadas na plataforma no Maxwell® CSC Instrument. Os eluatos de RNA resultantes foram testados em duplicado por RT-qPCR destinado ao HPRT1 para detetar qualquer contaminação de RNA nos controlos negativos proveniente de amostras de sangue total próximas. Não foi detetado qualquer RNA contaminante nos controlos negativos.

10. Avaliação do desempenho clínico

O desempenho clínico do Maxwell® CSC RNA Blood Kit foi avaliado por um laboratório clínico externo utilizando amostras de sangue total humano e o Maxwell® CSC Instrument.

10.A. Quantidade, qualidade e amplificabilidade de RNA

Tabela 6. Comparação de métodos. Foi extraído RNA de amostras de 2,5 ml de um total de 24 amostras de sangue total distintas utilizando o Maxwell® CSC RNA Blood Kit e o Maxwell® CSC Instrument. O RNA foi extraído das mesmas amostras utilizando o método de purificação de ácido nucleico padrão do laboratório (Método de referência do laboratório) para comparação. O RNA extraído foi testado por RT-qPCR para BCR-ABL1 destinado à transcrição de tipo selvagem ABL1 (proto-oncogene ABL 1) de acordo com os procedimentos padrão do laboratório clínico e a colheita foi determinada como o número de cópias de ABL1 detetadas. Foram testados eluatos de RNA da mesma amostra de sangue total pelo mesmo ensaio de RT-qPCR para minimizar os efeitos da variabilidade entre ensaios nos resultados. O RNA extraído utilizando o Maxwell® CSC RNA Blood Kit obteve ≥ 10.000 cópias de ABL1 no ensaio de RT-qPCR. As colheitas obtidas utilizando RNA extraído da mesma amostra de sangue foram concordantes com as de RNA extraído utilizando o Maxwell® CSC RNA Blood Kit e o Método de referência do laboratório.

Amostra de sangue	Colheita de RNA (cópias de ABL1)		Média C_q		ΔC_q (Maxwell® CSC –
	Maxwell® CSC System	Método de referência do laboratório	Maxwell® CSC System	Método de referência do laboratório	Método de referência do laboratório)
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. Reprodutibilidade

Tabela 7. Reprodutibilidade da extração de RNA por diferentes dispositivos de teste. Para confirmar a consistência dos resultados entre utilizadores no ambiente típico do utilizador, o RNA foi extraído de oito amostras de sangue total distintas por dois dispositivos de teste distintos utilizando o Maxwell® CSC RNA Blood Kit e o Maxwell® CSC Instrument. Os eluatos de RNA resultantes foram amplificados utilizando um ensaio de RT-qPCR para BCR-ABL1 destinado à transcrição de tipo selvagem ABL1 e os resultados obtidos de cada amostra foram comparados entre os dois dispositivos de teste. O RNA extraído pelos dois dispositivos de teste de todas as amostras foi amplificável e foram obtidas ≥ 10.000 cópias de ABL1, com uma diferença média de C_q (ΔC_q) entre dispositivos de teste de menos de 1 ciclo. A ΔC_q variou entre 0,03 e 1,25.

Amostra de sangue	Colheita de RNA (cópias de ABL1)		Média C_q		ΔC_q entre dispositivos de teste
	Dispositivo de teste 1	Dispositivo de teste 2	Dispositivo de teste 1	Dispositivo de teste 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. Contaminação cruzada

Foi avaliada a contaminação cruzada entre amostras durante a extração de RNA utilizando o Maxwell® CSC RNA Blood Kit no ambiente típico do utilizador. A extração de RNA utilizando o Maxwell® CSC RNA Blood Kit foi realizada com oito amostras de sangue total distintas e oito controlos negativos (água) na mesma execução do instrumento. Os Maxwell® CSC Cartridges contendo amostras de sangue total ou controlos negativos foram processados em posições alternadas adjacentes na plataforma no Maxwell® CSC Instrument. Os eluatos resultantes foram testados em duplicado por RT-qPCR destinado ao gene de tipo selvagem ABL1 para determinar se as amostras de controlo negativo continham algum RNA contaminante proveniente das amostras de sangue. Não foi detetado qualquer RNA contaminante nos controlos negativos, confirmando a inexistência de qualquer contaminação cruzada detetável durante a extração de RNA utilizando o Maxwell® CSC System.

11. Resolução de Problemas

Contacte a filial ou o distribuidor local da Promega para obter respostas para questões não abordadas neste manual. As informações de contacto estão disponíveis em: **www.promega.com**. Email: **techserv@promega.com**

Sintomas

Concentração mais baixa do que a esperada de RNA no eluato
(Uma amostra típica deve apresentar uma colheita >50 ng/ μ l de RNA purificado.)

Possíveis Causas e observações

A contagem de WBC da amostra de sangue situou-se acima ou abaixo do intervalo de utilização prevista do produto de 4×10^6 a 10×10^6 WBC/ml. O kit é otimizado para purificar RNA de amostras de sangue com uma contagem de WBC de 4×10^6 a 10×10^6 WBC/ml.

Foi utilizado um volume incorreto de sangue total. A adição superior ou inferior a 2,5 ml de sangue total pode resultar numa colheita inferior.

A amostra de sangue era demasiado antiga. As melhores colheitas são obtidas com amostras de sangue fresco. As amostras que tenham sido armazenadas entre 2–10 °C durante mais de 3 dias podem resultar em colheitas reduzidas.

A amostra foi armazenada abaixo de 2 °C ou acima de 10 °C antes da purificação. Temperaturas de armazenamento incorretas podem causar a lise dos WBC ou a degradação do RNA.

Podem ter sido introduzidas RNases durante a quantificação ou o processamento da amostra. Consulte a Secção 12 para obter informações sobre a criação de um ambiente livre de ribonucleases.

Remoção inadequada de sobrenadante a seguir a uma lise diferencial. Certifique-se de que o sobrenadante é removido o mais completamente possível.

O precipitado de WBC saiu do respetivo local durante a remoção do sobrenadante. Evite tocar no precipitado de WBC aquando da remoção do sobrenadante.

Tipo de amostra incorreto. O kit destina-se a ser utilizado com sangue total humano. Outros tipos de amostras (por exemplo, medula óssea, plasma, camada leuco-plaquetária, etc.) não foram testados com este kit.

Tipo de tubo para recolha de sangue incorreto. O kit destina-se a ser utilizado com sangue total humano em tubos para recolha EDTA. Outros tipos de tubos não foram testados com este kit e podem não ser compatíveis com a técnica de purificação.

11. Resolução de Problemas (continuação)

Sintomas

Baixa qualidade de RNA

(Os eluatos devem ter um rácio de A_{260}/A_{280} superior a 1,8 e um rácio de A_{260}/A_{230} entre 1,8 e 2,4.)

Possíveis Causas e observações

A contagem de WBC da amostra de sangue situou-se acima do intervalo de utilização prevista do produto de 4×10^6 a 10×10^6 WBC/ml. O kit é otimizado para purificar RNA de amostras de sangue com uma contagem de WBC de 4×10^6 a 10×10^6 WBC/ml.

Foi utilizado um volume incorreto de sangue total. A adição superior a 2,5 ml de sangue total pode resultar numa fraca pureza do eluato.

A amostra de sangue era demasiado antiga. As melhores colheitas são obtidas com amostras de sangue fresco. As amostras que tenham sido armazenadas entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante mais de 3 dias podem resultar numa qualidade de RNA reduzida.

A amostra foi armazenada abaixo de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou acima de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes da purificação. Temperaturas de armazenamento incorretas podem causar a lise dos WBC ou a degradação do RNA.

Remoção inadequada de sobrenadante a seguir a uma lise diferencial. Certifique-se de que o sobrenadante é removido o mais completamente possível.

Tipo de amostra incorreto. O produto destina-se a ser utilizado com sangue total humano. Outros tipos de amostras (por exemplo, medula óssea, plasma, camada leuco-plaquetária, etc.) não foram testadas com este produto.

Estão presentes níveis elevados de DNA nos eluatos (Os eluatos estão contaminados com DNA, o que pode interferir com ensaios a jusante.)

A contagem de WBC da amostra de sangue situa-se acima do intervalo de utilização prevista do produto de 4×10^6 a 10×10^6 WBC/ml.

Foi utilizado um volume incorreto de sangue total. A adição superior a 2,5 ml de sangue total pode levar a uma contaminação de DNA nos eluatos.

Não foi adicionada DNase I ao cartucho. Se possível, examine o poço n.º 4 nos cartuchos usados. O poço n.º 4 deve aparecer a verde (não a amarelo) caso tenha sido adicionada DNase I aos cartuchos na Secção 6.B, Passo 5.

Sintomas

O lisato pré-processado é demasiado viscoso para pipetar

Possíveis Causas e observações

A contagem de WBC da amostra de sangue situou-se acima do intervalo de utilização prevista do produto de 4×10^6 a 10×10^6 WBC/ml.

Foi utilizado um volume incorreto de sangue total. A adição superior a 2,5 ml de sangue total pode fazer com que os lisatos sejam viscosos e difíceis de pipetar.

Qualquer incidente grave que ocorra relacionado com o dispositivo que conduza, ou possa conduzir, a morte ou ferimentos graves de um utilizador ou paciente deverá ser comunicado imediatamente ao fabricante. Os utilizadores que se encontrem na União Europeia também deverão reportar incidentes graves à Autoridade Competente no país onde o utilizador e/ou o paciente se encontrem.

12. Criação de um ambiente livre de ribonucleases

As ribonucleases são extremamente difíceis de tornar inativas. Tenha cuidado para evitar introduzir atividade de RNase nas suas amostras de RNA durante ou após o isolamento. Esta observação é extremamente importante caso o material de base tenha sido difícil de obter ou seja insubstituível. As notas seguintes podem ajudar a evitar uma contaminação de RNase accidental das suas amostras.

1. Duas das mais importantes fontes de contaminação de RNase são as mãos do utilizador e as bactérias ou fungos que possam estar presentes nas partículas de pó suspensas no ar. Para evitar a contaminação a partir destas fontes, utilize uma técnica estéril durante o manuseamento dos reagentes fornecidos com este sistema. Use sempre luvas. Troque de luvas sempre que possa ter entrado em contacto com as ribonucleases.
2. Sempre que possível, deve ser utilizado material plástico descartável e esterilizado para o manuseamento de RNA. Estes materiais são geralmente livres de RNases e não necessitam de pré-tratamento para tornar a RNase inativa.
3. Trate as câmaras de eletroforese, o material plástico e o material em vidro não esterilizado antes da respetiva utilização para se certificar de que estão livres de RNases. Deixe o material em vidro na estufa a 200 °C de um dia para o outro e lave muito bem o material plástico com 0,1 N NaOH, 1 mM EDTA, seguido de água livre de RNases. Também podem ser utilizados produtos para a remoção de RNase disponíveis no mercado, seguindo as instruções do fabricante.

Nota: as câmaras de eletroforese podem ser contaminadas com ribonucleases, particularmente com RNase A, de análises de amostras de DNA. Sempre que possível, reserve um aparelho novo ou descontaminado apenas para a análise de RNA.

4. Trate as soluções que não são fornecidas com o sistema, adicionando dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1% v/v numa hotte. Incube de um dia para o outro com agitação à temperatura ambiente na hotte. Coloque na autoclave durante 30 minutos para remover qualquer vestígio de DEPC.



Atenção: o DEPC é suspeito de ser cancerígeno e deve ser utilizado apenas numa hotte química. O DEPC reage rapidamente com aminas e não pode ser utilizado para tratar tampões de Tris.

Nota: para todas as aplicações a jusante, é essencial que continue a proteger as suas amostras de RNA de RNases. Use luvas limpas e soluções livres de RNases e centrifugue os tubos.

13. Bibliografia

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

14. Produtos Relacionados

Instrumento e acessórios

Produto	Tamanho	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	1 de cada	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 de cada	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 de cada	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 de cada	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 de cada	AS8402
Microtube, 1,5 ml	1.000/pack	V1231

*Para utilização em diagnóstico in vitro. Este produto está disponível apenas em alguns países.

Maxwell® CSC Reagent Kits

Visite **www.promega.com** para obter uma lista dos Maxwell® CSC Purification Kits disponíveis.

15. Resumo das alterações

Foram realizadas as seguintes alterações à revisão 10/22 do presente documento:

1. O título da Secção 3 foi alterado para Finalidade prevista/Utilização prevista do produto.
2. Secções 9 e 10 adicionadas e secções subsequentes renumeradas.
3. Documento atualizado em conformidade com a Regulamentação (UE) 2017/746 sobre dispositivos médicos para diagnóstico in vitro.

^(a)Pat. dos EUA N.º 7,329,488 e S. Korean Pat. N.º 100483684.

© 2014–2022 Promega Corporation. Todos os direitos reservados.

Maxwell é uma marca comercial registada da Promega Corporation.

LpH é uma marca comercial registada da Steris Corporation.

Os produtos podem estar cobertos por patentes pendentes ou por patentes emitidas ou podem ter algumas limitações. Visite o nosso Web site para obter mais informações.

Todos os preços e especificações estão sujeitos a alterações sem aviso prévio.

As características dos produtos estão sujeitas a alteração. Contacte o nosso centro de assistência, Promega Technical Services, ou acesse ao catálogo da Promega online para obter as informações mais recentes acerca dos produtos da Promega.