

MANUAL TÉCNICO

# Maxwell<sup>®</sup> CSC RNA FFPE Kit

Instruções de utilização do produto  
**AS1360**

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

# Maxwell<sup>®</sup> CSC RNA FFPE Kit

Toda a literatura técnica está disponível na Internet em: [www.promega.com/protocols/](http://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](mailto: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 .....	6
5.A. Preparação de amostras FFPE .....	6
5.B. Preparação dos Maxwell <sup>®</sup> CSC RNA FFPE Cartridge.....	7
6. Execução do instrumento.....	9
7. Pós-purificação .....	11
8. Avaliação do desempenho analítico.....	12
8.A. Quantidade, qualidade e amplificabilidade de RNA .....	12
8.B. Reprodutibilidade .....	13
8.C. Substâncias interferentes (Inibição).....	13
8.D. Contaminação cruzada .....	14
9. Avaliação do desempenho clínico.....	14
9.A. Quantidade, qualidade e amplificabilidade de RNA .....	14
9.B. Reprodutibilidade .....	15
9.C. Contaminação cruzada .....	15
10. Resolução de Problemas .....	16
11. Criação de um ambiente livre de ribonucleases.....	18
12. Bibliografia.....	18
13. Produtos Relacionados .....	19
14. Resumo das alterações.....	19

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

## 1. Descrição

O Maxwell® CSC RNA FFPE Kit<sup>(a)</sup> é utilizado, em conjunto com o Maxwell® CSC Instruments especificados na Tabela 1 de modo a proporcionar um método fácil para a purificação automática e eficiente de RNA a partir de amostras de tecido humano mamário, do pulmão ou do cólon FFPE (fixadas em formol e incluídas em parafina). 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 45 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**

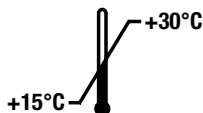
<b>Instrumento</b>	<b>Cat.#</b>	<b>Manual técnico</b>
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

**Princípio do Método:** o Maxwell® CSC RNA FFPE Kit purifica o ácido nucleico, utilizando partículas paramagnéticas, que fornecem uma fase sólida móvel para otimizar a captura, a lavagem e a purificação de amostras de RNA. O 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 entupidadas ou transferências de reagentes parciais, que resultam no processamento subótimo da purificação por outros sistemas automáticos normalmente utilizados.

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

PRODUTO	TAMANHO	CAT.#
Maxwell® CSC RNA FFPE Kit	48 preparações	AS1360

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



Inclui:

- 25 ml Óleo mineral
- 20 ml Tampão de lise
- 2 × 1 ml Proteinase K
- 100 µl Corante azul
- 2 × 1 ml MnCl<sub>2</sub>, 0,09 M
- 1 ml Tampão de DNase
- 3 frascos DNase I (liofilizada)
- 48 Maxwell® FFPE Cartridges
- 50 Êmbolos CSC/RSC
- 50 Tubos de eluição (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

**Condições de armazenamento:** armazene o Maxwell® CSC RNA FFPE Kit à temperatura ambiente (+15 a +30 °C). Armazene a DNase I reidratada entre -30 °C e -10 °C. Não congele/descongele mais do que 10 vezes.



**Informações de segurança:** os cartuchos contêm etanol e isopropanol. Estas substâncias devem ser consideradas como inflamáveis, nocivas e irritantes.



Os componentes do Maxwell® CSC RNA FFPE Kit são concebidos para serem utilizados com substâncias potencialmente infecciosas. Use equipamento de proteção individual adequado (por exemplo, luvas e óculos de proteção) durante o manuseamento de substâncias infecciosas. Cumpras as diretrizes institucionais quanto ao manuseamento e à eliminação de substâncias infecciosas utilizadas com este sistema.



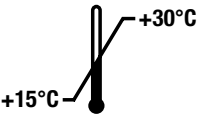













**Atenção:** manuseie os cartuchos com cuidado; as extremidades do selo podem ser cortantes.

**Informações adicionais:** os componentes do Maxwell® CSC RNA FFPE 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.

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

### Legenda dos símbolos

Símbolo	Explicação	Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro		Representante autorizado
	Conservar a +15 a +30 °C.		Fabricante
	Atenção		Irritante
	Risco de saúde		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 FFPE Kit destina-se a ser utilizado, em conjunto com o Maxwell® CSC Instruments e com o método de purificação Maxwell® CSC RNA FFPE, como um dispositivo médico (IVD) para diagnóstico in vitro para a realização do isolamento automático de RNA a partir de amostras de tecido humano mamário, do pulmão e do cólon FFPE (fixadas em formol e incluídas em parafina). O RNA purificado é adequado para utilização em ensaios de diagnóstico in vitro com base na amplificação.

O Maxwell® CSC RNA FFPE 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.

As amostras FFPE preparadas com formol neutro tamponado a 10% podem ser utilizadas com o Maxwell® CSC RNA FFPE Kit.

O Maxwell® CSC RNA FFPE 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 desempenho do Maxwell® CSC RNA FFPE Kit foi avaliado utilizando amostras de tecido FFPE recolhidas a partir de tecido humano mamário, do pulmão e cólon. Não se destina a utilização com amostras de tecido não FFPE, como tecido fresco ou congelado. O Maxwell® CSC RNA FFPE Kit não se destina a ser utilizado com outros tipos de amostras, incluindo amostras não humanas nem para a purificação de DNA.


O Maxwell® CSC RNA FFPE Kit não se destina a ser utilizado com amostras de tecido que tenham sido preparadas com fixadores diferentes do formol neutro tamponado a 10%.

O desempenho do Maxwell® CSC RNA FFPE Kit foi avaliado através do isolamento de RNA a partir de amostras de tecido FFPE cujo tamanho varia entre 0,1–2,0 mm<sup>3</sup>.

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 FFPE Kit.

## 5. Antes de começar

### Materiais que devem ser fornecidos pelo utilizador

- microcentrifugadora
- pipetadores e pontas de pipeta para o pré-processamento de amostras e transferência para cartuchos de reagentes pré-cheios
- tubos de 1,5–2,0 ml para a incubação de amostras (por exemplo, Microtubes, 1,5 ml; Cat.# V1231)
- blocos de aquecimento definidos para 56 °C e para 80 °C
- amostras FFPE com um volume total de tecido de 0,1–2,0 mm<sup>3</sup>; a espessura da secção não deve exceder 5 µm (**Nota:** as amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente [15–30 °C].)
-  • lâminas de barbear (**Nota:** tenha cuidado ao utilizar lâminas de barbear para raspar a amostra da lâmina.)

Reconstitua um frasco liofilizado de DNase I com 275 µl de Nuclease-Free Water, conforme necessário. Inverta o frasco para soltar a DNase I da parte inferior da tampa e agite suavemente para misturar; não agite por rotação.

### 5.A. Preparação de amostras FFPE

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 11, Criação de um ambiente livre de ribonucleases, para obter informações detalhadas.

### Pré-processamento de amostras de secção

1. Coloque a secção num tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml. Se estiver a utilizar secções de tecido montadas na lâmina, raspe a secção da lâmina com uma lâmina de barbear limpa.
2. Adicione 300 µl de óleo mineral aos tubos de amostra. Agite por rotação durante 10 segundos.
3. Aqueça as amostras a 80 °C durante 2 minutos. Aguarde até que as amostras fiquem à temperatura ambiente enquanto prepara a Master Mix.
4. Prepare uma Master Mix de tampão de lise, de proteinase K e de corante azul, conforme apresentado abaixo:

Reagente	Quantidade/Reação	Reações	
		(Número a executar + 1)	Total
Tampão de lise	224 µl	n + 1	224 µl × (n + 1)
Proteinase K	25 µl	n + 1	25 µl × (n + 1)
Corante azul	1 µl	n + 1	1 µl × (n + 1)

5. Adicione 250 µl de Master Mix a cada tubo de amostra e agite por rotação durante 5 segundos.
6. Centrifugue os tubos de amostra a 10.000 × g durante 20 segundos para separar as camadas. Se existir precipitado na camada aquosa (camada inferior azul), misture suavemente para dispersar o precipitado. Deixe ambas as fases no tubo.

7. Transfira os tubos de amostra para um bloco de aquecimento a 56 °C e incube durante 15 minutos.
8. Transfira os tubos de amostra para um bloco de aquecimento a 80 °C e incube durante 1 hora.
9. Remova os tubos de amostra do bloco de aquecimento e aguarde até que as amostras arrefeçam até à temperatura ambiente durante 15 minutos. Enquanto aguarda que as amostras arrefeçam, prepare o "cocktail" de DNase conforme descrita no Passo 10.
10. Prepare um "cocktail" de  $MnCl_2$ , de tampão de DNase e de DNase I pela ordem apresentada abaixo:

Reagente <sup>1</sup>	Quantidade/Reação	Reações	
		(Número a executar + 1)	Total
$MnCl_2$ , 0,09 M	26 $\mu$ l	n + 1	26 $\mu$ l $\times$ (n + 1)
Tampão de DNase <sup>2</sup>	14 $\mu$ l	n + 1	14 $\mu$ l $\times$ (n + 1)
DNase I <sup>3</sup>	10 $\mu$ l	n + 1	10 $\mu$ l $\times$ (n + 1)

<sup>1</sup>Caso sejam adicionados, individualmente, reagentes do "cocktail" de DNase aos tubos de amostra, certifique-se de que os adiciona pela ordem apresentada acima. Incorpore cada reagente pipetando cuidadosamente antes de adicionar o reagente seguinte.

<sup>2</sup>Armazene o tampão de DNase a 15–30 °C; este pode precipitar caso seja armazenado a temperaturas inferiores. Caso o tampão contenha precipitado, volte a solubilizar o precipitado aquecendo-o até 56 °C durante 2 minutos e, em seguida, agite-o brevemente por rotação para misturar.

<sup>3</sup>Armazene a restante DNase I reconstituída entre –30 a –10 °C.

11. Adicione 50  $\mu$ l de DNase A à fase aquosa azul de cada tubo de amostra. Misture pipetando 10 vezes.
12. Incube os tubos de amostra durante 15 minutos à temperatura ambiente (15–30 °C). Durante esta incubação, prepare os cartuchos conforme descrito na Secção 5.B.
13. Centrifugue os tubos de amostra à velocidade máxima numa microcentrifugadora durante 5 minutos.
14. Transfira imediatamente a fase aquosa azul para o poço n.º 1 de um Maxwell<sup>®</sup> CSC RNA FFPE Cartridge.

### 5.B. Preparação dos Maxwell<sup>®</sup> CSC RNA FFPE Cartridge

1. Troque de luvas antes de manusear os Maxwell<sup>®</sup> FFPE 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 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 no poço n.º 8 de cada cartucho.

### 5.B. Preparação dos Maxwell® CSC RNA FFPE Cartridge (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 FFPE Kit. Outros tubos de eluição podem não ser compatíveis com o Maxwell® CSC Instrument e podem afetar o desempenho de purificação de RNA.

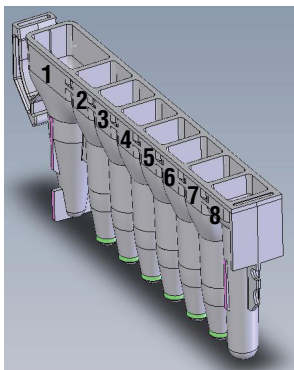
4. Adicione 50 µl de Nuclease-Free Water ao fundo de cada tubo de eluição. Os tubos de eluição devem permanecer abertos durante a purificação de RNA.

**Nota:** utilize apenas a Nuclease-Free Water fornecida no Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. A utilização de outros tampões de eluição pode afetar o desempenho de purificação de RNA ou a utilização a jusante.

#### Notas de preparação dos Maxwell® CSC RNA FFPE Cartridge



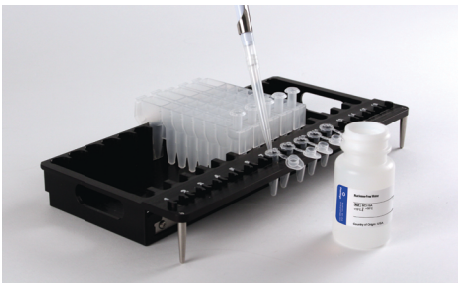
Os pingos de reagente ou de amostra retidos em qualquer parte do tabuleiro da plataforma deverão ser limpos com uma solução de água e detergente, seguido de um spray ou toalhete bactericida e em seguida, água. Não utilize lixívia em nenhum componente do instrumento.



#### Adições do utilizador ao conteúdo do poço:

1. Amostras pré-processadas
8. Êmbolo CSC/RSC

**Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge.** A amostra FFPE pré-processada é adicionada ao poço n.º 1 e um êmbolo é adicionado ao poço n.º 8.



**Figura 2. Instalação e configuração do tabuleiro de plataforma.** A Nuclease-Free Water é adicionada aos tubos de eluição, conforme indicado.

## 6. Execução do instrumento

O Maxwell® CSC RNA FFPE Method para o Maxwell® CSC Instrument pode ser transferido do Website da Promega: [www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod](http://www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod). O Maxwell® CSC RNA FFPE Method para o Maxwell® CSC 48 Instrument pode ser transferido do Website da Promega: [www.promega.com/resources/tools/maxwellcsc48method](http://www.promega.com/resources/tools/maxwellcsc48method)

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 Maxwell® CSC Instrument #TM457* ou o *Manual de funcionamento do Maxwell® CSC 48 Instrument #TM623*.

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. Selecione **Iniciar** no ecrã Página Inicial.
3. Digitalize ou introduza o código de barras do canto superior direito da etiqueta do Maxwell® CSC RNA FFPE 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 FFPE Kit é necessário para a purificação de RNA no Maxwell® CSC Instruments. 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, caso o código de barras não possa ser digitalizado.



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

4. 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.

## 6. Execução do instrumento (continuação)

5. 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 respectivos 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 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 Operação adequadas para o 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 da plataforma Maxwell® do instrumento.

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



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

## 7. Pós-purificação

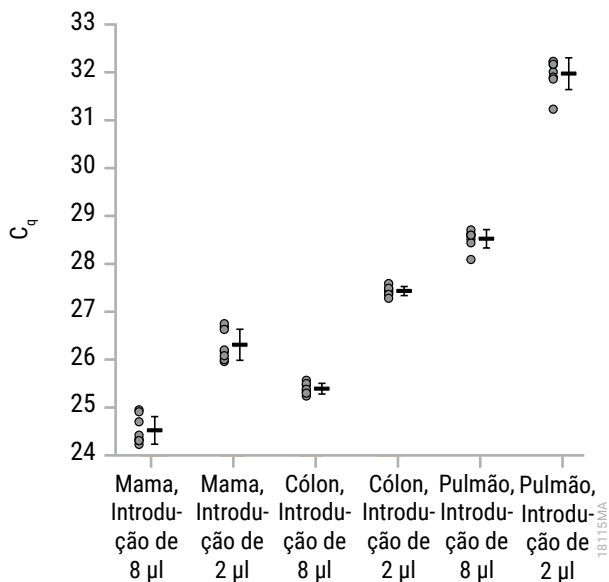
Determine se a colheita e a pureza da amostra de RNA purificado correspondem aos requisitos de introdução do ensaio de diagnóstico a jusante antes da utilização nesse ensaio. O desempenho do kit foi avaliado com base na purificação de RNA amplificável. Outros meios de quantificação, incluindo a absorvância ou a ligação de corante fluorescente, podem não se correlacionar com a amplificação (1). As leituras de absorvância das amostras FFPE podem sobreavaliar a colheita; recomendamos que utilize métodos mais específicos para determinar a colheita (1).

## 8. Avaliação do desempenho analítico

O desempenho analítico do Maxwell® CSC RNA FFPE Kit foi avaliado utilizando amostras de tecido FFPE de mama humana, do colón e do pulmão no Maxwell® CSC Instrument. Adicionalmente, o Maxwell® CSC RNA FFPE Kit foi avaliado com o Maxwell® CSC 48 Instrument para demonstrar o desempenho equivalente do kit em ambos os instrumentos.

### 8.A. Quantidade, qualidade e amplificabilidade de RNA

A quantidade, qualidade e amplificabilidade de RNA foram avaliadas para eluatos preparados a partir de secções de amostra FFPE da mama, do colón e do pulmão utilizando o Maxwell® CSC RNA FFPE Kit e o Maxwell® CSC Instrument. As amostras (2 µl e 8 µl) de cada eluato foram testadas num ensaio de RT-qPCR destinado a um gene de referência, HPRT1 (Hipoxantina fosforibosiltransferase 1). A introdução do eluato no RT-qPCR a 2 µl e 8 µl foi utilizada para avaliar a inibição, visto que uma diferença de introdução quádrupla deve resultar numa diferença de  $C_q$  de cerca de 2 ciclos. Todas as amostras foram amplificadas com sucesso em ambos os volumes de introdução.



**Figura 4. Os valores de RT-qPCR  $C_q$ , média e desvio padrão para eluatos preparados a partir de secções de FFPE da mama, do colón e do pulmão.** No caso de cada conjunto de amostras, os pontos à esquerda representam os valores de  $C_q$  da amostra individual, ao passo que a média com o desvio padrão é apresentada à direita.

## 8.B. Reprodutibilidade

**Tabela 2. Reprodutibilidade entre os utilizadores.** Para avaliar a variabilidade do utilizador, as amostras de tecido FFPE pré-processadas foram agrupadas e, em seguida, extraídas utilizando o Maxwell® CSC RNA FFPE Kit e o Maxwell® CSC Instrument. Os eluatos foram amplificados num ensaio de RT-qPCR destinado ao gene HPRT1 e as concentrações de RNA foram calculadas a partir do valor de  $C_q$ . As médias e o coeficiente por cento de variação (% CV) para a concentração de RNA obtidos a partir de eluatos em 3 utilizadores diferentes e são apresentados abaixo.

		<b>Concentração (ng/μl)</b>	<b>Desvio padrão (ng/μl)</b>	<b>% CV</b>
Número do utilizador	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
<b>Média de três utilizadores diferentes</b>		<b>1,44</b>	<b>0,104</b>	<b>7,2</b>

\*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.

## 8.C. Substâncias interferentes (Inibição)

**Tabela 3. Inibição de substâncias endógenas na amostra.** Os eluatos foram preparados a partir de amostras de tecido FFPE da mama, do pulmão e do cólon utilizando o Maxwell® CSC RNA FFPE Kit e o Maxwell® CSC Instrument. Amostras (2 μl e 8 μl) de cada eluato foram amplificadas no RT-qPCR destinado ao gene HPRT e o  $\Delta C_q$  (diferença entre o  $C_q$  médio de cada volume de introdução do eluato) calculado. O  $\Delta C_q$  entre as introduções de 2 μl e 8 μl variaram entre 1,94 a 2,04 ciclos. Um  $\Delta C_q$  entre as introduções do volume de 2 ciclos não corresponde a qualquer inibição detetável da amplificação de DNA. Não foi detetada qualquer inibição de qualquer um dos tecidos testados.

<b>Tecido (n = 8)</b>	<b><math>C_q</math> para introdução de 8 μl (Ciclos)</b>	<b><math>C_q</math> para introdução de 2 μl (Ciclos)</b>	<b><math>\Delta C_q</math></b>
FFPE da mama	24,52	26,46	1,94
FFPE do cólon	25,39	27,43	2,04
FFPE do pulmão	28,52	30,49	1,96

#### 8.D. Contaminação cruzada

O RNA foi purificado de 8 amostras de tecido FFPE diferentes e 8 amostras de controlo negativo utilizando o Maxwell® CSC Instrument e o Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Os cartuchos Maxwell® contendo as amostras de tecido FFPE e os cartuchos Maxwell® contendo o controlo negativo (água) foram processados em posições alternadas na plataforma no Maxwell® CSC Instrument e os eluatos resultantes foram testados em duplicado por RT-qPCR destinado ao HPRT1 para procurar a contaminação do RNA dos controlos negativos das amostras próximas. Não foi observado qualquer RNA contaminante nos controlos negativos.

#### 9. Avaliação do desempenho clínico

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

##### 9.A. Quantidade, qualidade e amplificabilidade de RNA

**Tabela 4. Comparação de métodos.** O RNA foi purificado de 15 amostras de tecido FFPE utilizando o Maxwell® CSC RNA FFPE Kit e o método de extração padrão do laboratório (Método de referência de laboratório) e, em seguida, amplificado pelo RT-qPCR destinado ao gene HPRT1 e os resultados de  $C_q$  dos dois métodos comparados. O RNA foi purificado utilizando o Maxwell® CSC RNA FFPE Kit amplificado para todas as amostras e valores de  $C_q$  fornecidos entre 25,86 e 35,35. Os eluatos preparados utilizando o método de referência de laboratório falharam ao amplificar 3 das 15 amostras testadas. Os 3 eluatos que não amplificaram tinham valores de  $C_q$  superiores do que os eluatos das mesmas amostras preparadas pelo Maxwell® CSC RNA FFPE Kit.

Amostra de tecido FFPE	Média $C_q$	
	Maxwell® CSC	Método de referência de laboratório
1	29,55	33,78
2	35,35	Sem $C_q$
3	25,86	31,37
4	27,75	34,49
5	32,27	Sem $C_q$
6	33,02	34,49
7	32,69	Sem $C_q$
8	27,60	36,49
9	31,43	36,77
10	30,35	34,06
11	33,00	35,83
12	31,71	33,39
13	31,27	35,49
14	30,98	34,75
15	33,18	43,71

## 9.B. Reprodutibilidade

**Tabela 5. Reprodutibilidade entre dispositivos de teste.** Para confirmar a consistência dos resultados entre dispositivos de teste no ambiente típico do dispositivo de teste, o RNA foi extraído de oito amostras de tecido FFPE por dois dispositivos de teste separados utilizando o Maxwell® CSC RNA FFPE Kit e o Maxwell® CSC Instrument. Os eluatos resultantes foram amplificados utilizando RT-qPCR destinado ao gene HPRT1 e os resultados obtidos de cada amostra comparados entre os dois dispositivos de teste.

Amostra de tecido FFPE	Média C <sub>q</sub>	
	Dispositivo de teste 1	Dispositivo de teste 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. Contaminação cruzada

Para confirmar que a contaminação cruzada entre amostras não corre no ambiente típico do utilizador, o RNA foi purificado de 8 amostras de tecido FFPE diferentes e 8 amostras de controlo negativo (água) utilizando o Maxwell® CSC Instrument e o Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Cartuchos Maxwell® contendo amostras de tecido FFPE e cartuchos Maxwell® contendo controlo negativo (água) foram processados em posições alternadas na plataforma no Maxwell® CSC Instrument. Eluatos da amostra e eluatos do controlo negativo foram testados em duplicado pelo RT-qPCR destinado ao gene HPRT1 para determinar se tinha ocorrido qualquer contaminação cruzada das amostras negativas. Oito das 8 amostras negativas forneceram resultados negativos, confirmando que não tinha ocorrido qualquer contaminação cruzada detetável.

## 10. 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**. E-mail: **techserv@promega.com**

### Sintomas

Concentração mais baixa do que a esperada de RNA no eluato  
(Uma secção FFPE deve apresentar uma colheita de RNA amplificável, dependendo do tamanho do tecido, celularidade, manuseamento e condição da fixação de formol.)

### Causas e observações

O desempenho do kit foi avaliado através do isolamento de RNA a partir de amostras de tecido FFPE cujo tamanho varia entre 0,1 mm<sup>3</sup> a 2,0 mm<sup>3</sup>. Utilize secções que estejam dentro deste intervalo.

O kit foi concebido para ser utilizado com amostras de tecido FFPE recolhidas a partir de tecido humano mamário, do pulmão e cólon. Os tempos e temperaturas de incubação podem não ser as ideais para outros tipos de amostra.

O kit não foi concebido para ser utilizado com amostras de tecido que tenham sido preparadas com fixadores diferentes do formol neutro tamponado a 10%. Confirme se não foi utilizado um fixador alternativo.

Podem ter sido introduzidas RNases durante a quantificação ou o processamento da amostra. Consulte a Secção 11 para obter informações sobre a criação de um ambiente livre de ribonucleases.

O tecido utilizado foi o de uma secção ou lâmina com coloração. Não existem quaisquer características para secções ou lâminas com coloração. Repita a purificação com uma secção ou lâmina sem coloração.

O desempenho do kit foi avaliado com base na purificação de RNA amplificável. Outros meios de quantificação, incluindo a absorvância ou a ligação de corante fluorescente, podem não se correlacionar com a amplificação. Utilize um método de quantificação da amplificação para avaliar a colheita.

**Sintomas****Causas e observações**

Qualidade mais baixa do que a esperada  
(O eluato contém RNA extremamente fragmentado  
ou inibidores de ensaios a jusante.)

A fixação de formol e subsequente inversão de ligações cruzadas irão fragmentar o RNA. Caso o RNA seja fragmentado antes da extração/purificação, o RNA fragmentado será purificado com este kit. Repita com uma secção adjacente para avaliar se existe algum problema com a secção selecionada ou com o processo.

Alguns ensaios de amplificação são particularmente sensíveis à presença de inibidores. Os controlos de ensaios a jusante devem identificar a presença de um inibidor de amplificação no eluato. É da responsabilidade do utilizador confirmar a compatibilidade deste produto com todos os ensaios a jusante.

O DNA presente nos eluatos  
(Os eluatos estão contaminados com DNA,  
o que pode interferir com os ensaios a jusante.)

O "cocktail" de DNase adicionado à amostra fornece um excesso de atividade de DNase quando utilizado com amostras de tecido FFPE cujo tamanho varia entre 0,1 mm<sup>3</sup> a 2,0 mm<sup>3</sup>. Não foi concebido para amostras fora deste intervalo e pode não reproduzir resultados ótimos. Utilize secções que estejam dentro deste intervalo.

Uma mistura insuficiente do "cocktail" de DNase na amostra durante o pré-processamento pode resultar numa degradação incompleta do DNA. Certifique-se de que mistura bem o "cocktail" de DNase na amostra.

Se os componentes do "cocktail" de DNase forem adicionados à amostra separadamente, certifique-se de que os adiciona pela ordem indicada na Secção 5.A, Passo 10. Para além disso, certifique-se de que mistura bem cada componente à medida que o adiciona. A adição de componentes por uma ordem diferente ou uma mistura incompleta pode inativar a DNase.

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.

## 11. 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 esteja apenas disponível numa quantidade limitada. As notas seguintes podem ajudar a evitar uma contaminação de RNase acidental 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 asséptica 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, utilize 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 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.
4. Trate as soluções que não são fornecidas com o sistema, adicionando dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1% 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.

## 12. Bibliografia

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

### 13. Produtos Relacionados

#### Instrumento e acessórios

<b>Produto</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Cat.#</b>
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	1000/pack	V1231

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

#### Maxwell® CSC Reagent Kits

Visite [www.promega.com](http://www.promega.com) para obter uma lista dos Maxwell® CSC Purification Kits disponíveis.

### 14. Resumo das alterações

Foram realizadas as seguintes alterações à revisão 11/22 do presente documento:

1. O título da Secção 3 foi alterado Finalidade prevista/Utilização prevista do produto.
2. As Secções 8 e 9 foram adicionadas.
3. O documento foi atualizado de acordo com o Regulamento (UE) 2017/746 relativo a dispositivos médicos para diagnóstico in vitro.

<sup>(a)</sup>Pat. dos EUA N.º 7,329,488 e Korean Pat. N.º 10-0483684.

© 2013–2022 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.