

MANUEL TECHNIQUE

Maxwell® CSC RNA FFPE Kit

Mode d'emploi du produit
AS1360

Mise en garde : manipulez les cartouches avec précautions ;
les bords d'étanchéité peuvent être coupants.



MODE D'EMPLOI
DU PRODUIT
AS1360



PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanovre, Allemagne

Maxwell® CSC RNA FFPE Kit

Toute la littérature technique est disponible sur : www.promega.com/protocols/
Consultez le site Internet pour vérifier que vous utilisez bien la version la plus récente de ce manuel technique. Si vous avez des questions concernant l'utilisation de ce système, envoyez un e-mail à Promega Technical Services : techserv@promega.com

1. Description.....	2
2. Composants du produit, conditions de stockage et légende des symboles	3
3. Destination/Usage prévu du produit	5
4. Limites d'utilisation du produit.....	5
5. Avant de commencer	6
5.A. Préparation d'échantillons FFPE.....	6
5.B. Préparation des cartouches Maxwell® CSC RNA FFPE.....	8
6. Fonctionnement de l'appareil.....	10
7. Après la purification.....	12
8. Évaluation des performances analytiques.....	13
8.A. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ARN.....	13
8.B. Reproductibilité	14
8.C. Substances interférentes (inhibition)	14
8.D. Contamination croisée	15
9. Évaluation des performances cliniques	15
9.A. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ARN.....	15
9.B. Reproductibilité	16
9.C. Contamination croisée	16
10. Dépannage	17
11. Création d'un environnement sans ribonucléase	19
12. Références.....	19
13. Produits apparentés	20
14. Récapitulatif des modifications.....	20

Le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit n'est disponible que dans certains pays.

1. Description

Le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit^(a) est utilisé en association avec les appareils Maxwell® CSC Instrument spécifiés dans le Tableau 1 pour offrir une méthode facile de purification automatique efficace de l'ARN issu d'échantillons de tissus humains de poitrine, poumon ou côlon fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). Les appareils Maxwell® CSC Instrument sont conçus pour être utilisés avec des cartouches de réactifs pré-dispensés et des réactifs supplémentaires fournis dans le kit avec des méthodes de purification préprogrammées, pour une simplicité et une facilité d'emploi maximales. Les appareils Maxwell® CSC Instrument peuvent traiter d'un au nombre maximum autorisé d'échantillons en 45 minutes environ et l'ARN purifié peut être utilisé directement dans diverses applications en aval fondées sur l'amplification, telles que RT-PCR.

Tableau 1. Appareils pris en charge

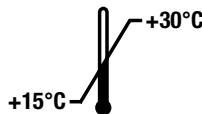
Appareil	Cat.#	Manuel technique
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Principe de la méthode : le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit purifie l'acide nucléique à l'aide de particules paramagnétiques, qui fournissent une phase solide mobile pour optimiser le prélèvement d'échantillons, le lavage et la purification de l'ARN. Les appareils Maxwell® CSC Instrument sont des appareils magnétiques de traitement des particules. Ce système permet la fixation efficace de l'ARN aux particules paramagnétiques dans le premier puits d'une cartouche préremplie et déplace l'échantillon dans les puits de la cartouche. Cette approche de la capture magnétique évite des problèmes courants associés aux systèmes de traitement des liquides, tels que le colmatage des cônes ou des transferts partiels de réactifs, qui entraînent une purification sous-optimale par d'autres systèmes automatiques courants.

2. Composants du produit, conditions de stockage et légende des symboles

PRODUIT	TAILLE	CAT. #
Maxwell® CSC RNA FFPE Kit	48 préparations	AS1360

Pour diagnostic in vitro. Usage professionnel uniquement. Suffisant pour 48 isolements automatisés à partir des échantillons FFPE. Les Maxwell® CSC Cartridges sont à usage unique.



Inclut :

- 25 ml Huile minérale
- 20 ml Tampon de lyse
- 2 x 1 ml Protéinase K
- 100 µl Blue Dye
- 2 x 1 ml MnCl₂, 0,09 M
- 1 ml Tampon de DNase
- 3 flacons DNase I (lyophilisé)
- 48 Cartouches Maxwell® FFPE
- 50 Plongeurs CSC/RSC
- 50 Tubes d'élution (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

Conditions de stockage : stockez le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit à température ambiante (+15 à +30 °C). Stockez le DNase I réhydraté entre -30 °C et -10 °C. Ne congelez-décongelez pas plus de dix fois.



Informations relatives à la sécurité : les cartouches contiennent de l'éthanol et de l'isopropanol. Ces substances doivent être considérées comme inflammables, nocives et irritantes.



Les composants du Maxwell® CSC RNA FFPE Kit sont conçus pour être utilisés avec des substances potentiellement infectieuses. Portez des équipements de protection individuelle appropriés (ex : gants et lunettes de sécurité) lors de la manipulation de substances infectieuses. Suivez les directives de votre établissement concernant la manipulation et l'élimination de toute substance infectieuse utilisée en conjonction avec ce système.

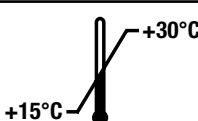


Mise en garde : manipulez les cartouches avec précautions ; les bords d'étanchéité peuvent être coupants.

Informations supplémentaires : les composants du Maxwell® CSC RNA FFPE Kit sont homologués et ont passé des tests de contrôle qualité pour fonctionner ensemble. Il n'est pas recommandé de mélanger les composants du kit entre différents lots. Utilisez uniquement les composants fournis dans le kit. N'utilisez pas de cartouches reçues avec un joint endommagé.

2. Composants du produit, conditions de stockage et légende des symboles (suite)

Légende des symboles

Symbol	Explication	Symbol	Explication
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro	EC REP	Représentant agréé
	Stocker entre +15 et +30 °C.		Fabricant
	Mise en garde		Irritant
	Danger pour la santé		Contenu suffisant pour « n » tests
CE	Conformité Européenne		Avertissement. Risque biologique.
	Avertissement. Risque de pincement.	REF	Référence
LOT	Numéro de lot		Ne pas réutiliser

3. Destination/Usage prévu du produit

Le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit est conçu pour être utilisé en conjonction avec les appareils Maxwell® CSC Instrument et la méthode de purification Maxwell® CSC RNA FFPE comme dispositif médical de diagnostic in vitro (IVD) pour isoler l'ARN automatiquement à partir d'échantillons de tissus humains de poitrine, poumon ou côlon fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). L'ARN purifié est adapté aux essais de diagnostic in vitro fondés sur l'amplification.

Le Maxwell® CSC RNA FFPE kit est destiné à être utilisé à une température comprise entre 15 °C et 30 °C. Toute utilisation en dehors de cette plage de température peut produire des résultats sous-optimaux.

Les échantillons FFPE préparés à l'aide de formaline neutre à 10 % peuvent être utilisés avec le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit.

Le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit est destiné à un usage professionnel uniquement. Les résultats de diagnostic obtenus à l'aide d'ARN purifié avec ce système doivent être interprétés avec d'autres données cliniques ou de laboratoire.

4. Limites d'utilisation du produit

Les performances du Maxwell® CSC RNA FFPE Kit ont été évaluées avec des échantillons FFPE recueillis à partir de tissus humains de la poitrine, des poumons et du côlon. Il n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus non FFPE, tels que des tissus frais ou congelés. Le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit n'est pas conçu pour être utilisé avec d'autres types d'échantillons, notamment de tissus non humains, ou pour la purification de l'ADN.

Le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus qui ont été préparés avec d'autres fixatifs que la formaline neutre à 10 %.

Les performances du Maxwell® CSC RNA FFPE Kit ont été évaluées en isolant l'ARN des échantillons de tissus FFPE de taille comprise entre 0,1 et 2,0 mm³.

L'utilisateur est tenu de valider la performance des acides nucléiques purifiés dans les applications de diagnostic en aval. Des contrôles appropriés doivent être prévus lors des applications de diagnostic en aval utilisant de l'ARN purifié avec le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit.

5. Avant de commencer

Matériel à fournir par l'utilisateur

- microcentrifugeuse
- pipettes et cônes de pipettes pour le prétraitement d'échantillons et leur transfert dans des cartouches de réactifs préremplis
- tubes de 1,5–2,0 ml pour l'incubation des échantillons (ex : Microtubes, 1,5 ml; Cat. # V1231)
- blocs chauffants réglés à 56 °C et à 80 °C
- échantillons FFPE avec un volume total de tissus compris entre 0,1 et 2,0 mm³; l'épaisseur de la section ne doit pas dépasser 5 µm (Remarque : les échantillons doivent être stockés à température ambiante [15–30 °C].)
- lames de rasoir (Remarque : soyez prudent lors de l'utilisation de lames de rasoir pour raceler l'échantillon sur la glissière.)



Si nécessaire, reconstituez un flacon lyophilisé de DNase I avec 275 µl de Nuclease-Free Water. Retournez le flacon pour rincer le DNase I du dessous du bouchon et agitez délicatement pour mélanger. Ne vortexez pas.

5.A. Préparation d'échantillons FFPE

Maintenez un environnement sans RNase pendant le traitement. Utilisez toujours des cônes de pipettes résistants à l'aérosol et sans RNase. Changez régulièrement de gants afin de réduire les risques de contamination par la RNase. Voir Section 11, Création d'un environnement sans ribonucléase, pour plus de détails.

Prétraitement des échantillons de section

1. Placez la section dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml. Si vous utilisez des sections de tissus montées sur glissière, raclez la section de la glissière à l'aide d'une lame de rasoir propre.
2. Ajoutez 300 µl d'huile minérale aux tubes d'échantillon. Vortexez pendant 10 secondes.
3. Chauffez les échantillons à 80 °C pendant 2 minutes. Placez les échantillons à température ambiante pendant la préparation du master mix.
4. Préparez un master mix de tampon de lyse, de Protéinase K et de Blue Dye comme illustré ci-dessous :

Réactif	Quantité/Réaction (Nombre à réaliser + 1)	Réactions (Nombre à réaliser + 1)	Total
Tampon de lyse	224 µl	n + 1	224 µl × (n + 1)
Protéinase K	25 µl	n + 1	25 µl × (n + 1)
Blue Dye	1 µl	n + 1	1 µl × (n + 1)

5. Ajoutez 250 µl de master mix à chaque tube d'échantillon et vortexez pendant 5 secondes.

6. Centrifugez les tubes d'échantillon à $10\,000 \times g$ pendant 20 secondes pour séparer les couches. Si un agglomérat est présent dans la couche aqueuse (couche bleue inférieure), mélangez délicatement pour disperser cet agglomérat. Laissez les deux phases dans le tube.
7. Transférez les tubes d'échantillon vers un bloc chauffant à 56 °C et laissez incuber pendant 15 minutes.
8. Transférez les tubes d'échantillon vers un bloc chauffant à 80 °C et laissez incuber pendant 1 heure.
9. Retirez les tubes d'échantillon du bloc chauffant et laissez les échantillons redescendre à température ambiante pendant 15 minutes. Pendant que les échantillons refroidissent, préparez le cocktail de DNase comme indiqué à l'étape 10.
10. Préparez un cocktail de MnCl₂, de tampon de DNase et de DNase I dans l'ordre illustré ci-dessous :

Réactions			
Réactif¹	Quantité/Réaction	(Nombre à réaliser + 1)	Total
MnCl ₂ , 0,09 M	26 µl	n + 1	26 µl × (n + 1)
Tampon de DNase ²	14 µl	n + 1	14 µl × (n + 1)
DNase I ³	10 µl	n + 1	10 µl × (n + 1)

¹Si les réactifs du cocktail de DNase sont ajoutés individuellement aux tubes d'échantillon, veillez à bien les ajouter dans l'ordre indiqué ci-dessus. Incorporez chaque réactif en pipetant soigneusement avant d'ajouter le réactif suivant.

²Stockez le tampon de DNase entre 15 et 30 °C ; il peut se précipiter s'il est stocké à des températures inférieures. Si le tampon contient du précipité, resolubilisez le précipité en chauffant à 56 °C pendant 2 minutes puis en vortexant brièvement pour mélanger.

³Stockez le DNase I reconstitué restant entre -30 et -10 °C.

11. Ajoutez 50 µl de cocktail de DNase à la phase aqueuse bleue de chaque tube d'échantillon. Mélangez en pipetant 10 fois.
12. Incubez les tubes d'échantillon pendant 15 minutes à température ambiante (15 à 30 °C). Pendant cette incubation, préparez les cartouches comme indiqué à la Section 5.B.
13. Centrifugez les tubes d'échantillon à pleine vitesse dans une microcentrifugeuse pendant 5 minutes.
14. Transférez immédiatement la phase aqueuse bleue dans le puits n°1 d'une cartouche Maxwell® CSC RNA FFPE.

5.B. Préparation des cartouches Maxwell® CSC RNA FFPE

1. Changez de gants avant de manipuler les cartouches Maxwell® FFPE, les plongeurs CSC/RSC et les tubes d'élution. Les cartouches sont installées dans le ou les plateaux en dehors de l'appareil et dans le ou les plateaux contenant les cartouches. Les échantillons sont alors transférés dans l'appareil pour être purifiés. Placez chaque cartouche dans le plateau avec le puits n°1 (le plus grand puits de la cartouche) le plus éloigné des tubes d'élution (Figure 2). Appuyez sur la cartouche vers le bas pour bien la mettre en place. Veillez à ce que les deux extrémités de la cartouche soient bien en place dans le plateau. Retirez délicatement le joint afin de retirer tout le joint du haut de la cartouche. Veillez à ce que toute la bande d'étanchéité et tout résidu d'adhésif soient retirés de la cartouche.



Mise en garde : manipulez les cartouches avec précaution. Les bords d'étanchéité peuvent être coupants.

2. Placez un plongeur dans le puits n°8 de chaque cartouche.
3. Placez un tube d'élution vide à la position du tube d'élution pour chaque cartouche dans le ou les plateaux.
4. Ajoutez 50 µl de Nuclease-Free Water au fond de chaque tube d'élution. Les tubes d'élution doivent rester ouverts pendant la purification de l'ARN.

Remarque : utilisez uniquement les tubes d'élution fournis dans le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Les autres tubes d'élution ne sont pas forcément compatibles avec le Maxwell® CSC Instrument et peuvent affecter les performances de purification de l'ARN.

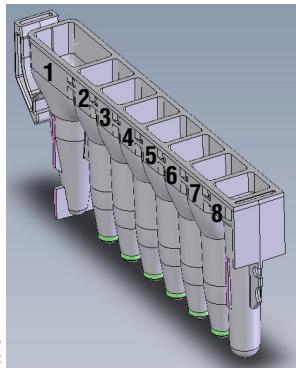
5. Ajoutez 50 µl de Nuclease-Free Water au fond de chaque tube d'élution. Les tubes d'élution doivent rester ouverts pendant la purification de l'ARN.

Remarque : utilisez uniquement la Nuclease-Free Water fournie dans le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. L'utilisation d'autres tampons d'élution peut affecter les performances de purification de l'ARN ou l'utilisation ultérieure.

Notes de préparation des cartouches Maxwell® CSC RNA FFPE



Les échantillons ou réactifs renversés sur toute partie du plateau doivent être nettoyés avec une solution d'eau et de détergent, puis une lingette ou un spray bactéricide et enfin de l'eau. N'utilisez de l'eau de Javel sur aucune partie de l'appareil.



Contenu du puits ajouté par l'utilisateur :

1. Échantillons prétraités
8. Plongeur CSC/RSC

3397C

Figure 1. Cartouche Maxwell® CSC. L'échantillon FFPE prétraité est ajouté au puits n°1 et un plongeur est ajouté au puits n°8.



Figure 2. Installation et configuration du plateau. De la Nuclease-Free Water est ajoutée aux tubes d'élution comme indiqué.

6. Fonctionnement de l'appareil

La méthode Maxwell® CSC RNA FFPE pour le Maxwell® CSC Instrument peut être téléchargée depuis le site Web Promega : www.promega.com/resources/tools/maxwellessmethod. La méthode Maxwell® CSC RNA FFPE pour le Maxwell® CSC 48 Instrument peut être téléchargée depuis le site Web Promega : www.promega.com/resources/tools/maxwellcsc48method

Si vous pensez que votre appareil peut être contaminé avec du RNase, nettoyez l'appareil avant de l'utiliser à l'aide d'une solution d'eau et de détergent, telle que Steris LpH®. Respectez les instructions de la section Nettoyage et entretien du *manuel d'utilisation du Maxwell® CSC Instrument #TM457* ou du *manuel d'utilisation du Maxwell® CSC 48 Instrument #TM623*.

1. Démarrez le Maxwell® Instrument et la tablette. Connectez-vous à la tablette et démarrez le logiciel Maxwell® en mode IVD en touchant deux fois l'icône sur le bureau. L'appareil réalise un autotest et place toutes les pièces mobiles en position de repos.
2. Sélectionnez **Démarrer** sur l'écran d'Accueil.
3. Scannez ou saisissez le code barres dans l'angle supérieur droit de l'étiquette du Maxwell® CSC RNA FFPE Kit et touchez **OK** pour sélectionner automatiquement la méthode à utiliser (Figure 3).

Remarque : le code barres de méthode du Maxwell® CSC RNA FFPE Kit est requis pour la purification de l'ARN sur les appareils Maxwell® CSC Instrument. L'étiquette du kit contient deux codes barres. Le code barres de la méthode est indiqué à la Figure 3. S'il n'est pas possible de scanner le code barres, contactez Promega Technical Services.

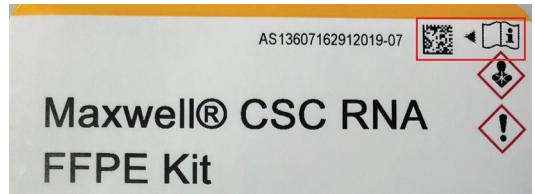


Figure 3. Étiquette de kit indiquant le code barres à scanner. Scannez le code barres affiché dans la zone rouge en haut à droite de l'étiquette du kit pour lancer un cycle de purification.

4. Sur l'écran « Configuration des cartouches », touchez les positions de cartouches pour sélectionner ou désélectionner toute position à utiliser pour ce cycle d'extraction. Entrez toute information de suivi des échantillons requise et touchez le bouton **Poursuivre**.
- Remarque :** lors de l'utilisation du Maxwell® CSC 48 Instrument, touchez le bouton **Avance** ou **Recul** pour sélectionner ou désélectionner les positions des cartouches sur chaque plateau.

5. Une fois la porte ouverte, confirmez que tous les éléments de la liste de contrôle d'extraction ont été réalisés. Vérifiez que les échantillons prétraités ont été ajoutés au puits n°1 des cartouches, que les cartouches sont chargées sur l'appareil, que des tubes d'élution débouchés sont présents avec le tampon d'élution et que les plongeurs sont dans le puits n°8. Transférez le plateau contenant les cartouches préparées sur la plateforme de l'appareil Maxwell®.

Insertion du plateau Maxwell® : tenez le plateau par les côtés pour éviter de déplacer les cartouches. Vérifiez que le plateau est placé dans l'appareil Maxwell® avec les tubes d'élution le plus près de la porte. Inclinez l'arrière du plateau vers le bas et placez-le dans l'appareil de sorte que l'arrière du plateau repose contre l'arrière de la plateforme de l'appareil. Appuyez sur l'avant du plateau vers le bas pour bien installer le plateau sur la plateforme de l'appareil. Si vous avez des difficultés à installer le plateau sur la plateforme, vérifiez l'orientation correcte du plateau. Vérifiez que le plateau est à plat sur la plateforme de l'appareil et bien en place.

Remarque : vérifiez l'identifiant sur les plateaux Maxwell® à 24 positions afin de déterminer s'ils doivent être placés à l'avant ou à l'arrière de l'appareil.

6. Confirmez que l'ensemble du prétraitement indiqué a été réalisé et touchez **Démarrer** pour fermer la porte de l'appareil et lancer le traitement.

Remarque : lorsque vous utilisez un appareil Maxwell® à 48 positions, si le système Vision a été activé, les plateaux seront scannés lors du retrait de la porte. Toute erreur de configuration des plateaux (ex : plongeurs pas dans le puits n°8, tubes d'élution absents ou ouverts) entraîne un retour du logiciel à l'écran « Configuration des cartouches » et les positions qui posent problème sont repérées par un point d'exclamation dans un cercle rouge. Touchez le point d'exclamation pour obtenir une description de l'erreur et résoudre tous les états d'erreur. Touchez à nouveau le bouton **Démarrer** pour scanner à nouveau le plateau et lancer le cycle d'extraction.



7. Avertissement : risque de pincement. L'appareil Maxwell® lance immédiatement le cycle de purification. L'écran affiche les étapes réalisées et la durée restante approximative du cycle.

Remarques :

1. Le bouton **Annuler** permet de mettre fin au cycle. Tous les échantillons d'un cycle abandonné seront perdus.
 2. Si le cycle est abandonné avant la fin, il pourra vous être demandé de vérifier si les plongeurs sont encore chargés sur la barre de plongeurs. Si des plongeurs sont présents sur la barre, vous devez réaliser le **Nettoyage** lorsque cela vous est demandé. Si aucun plongeur n'est présent sur la barre, vous pouvez ignorer le **Nettoyage** lorsque cela vous est demandé. Les échantillons seront perdus.
8. Une fois le cycle terminé, l'interface utilisateur affiche un message indiquant que la méthode est terminée.

6. Fonctionnement de l'appareil (suite)

Fin de cycle

9. Suivez les instructions à l'écran à la fin de la méthode pour ouvrir la porte. Vérifiez que les plongeurs sont situés dans le puits n°8 de la cartouche à la fin du cycle. Si les plongeurs ne sont pas retirés de la barre, suivez les instructions du manuel d'utilisation approprié à votre appareil Maxwell® (voir le Tableau 1) pour réaliser une procédure de **Nettoyage** afin d'essayer de décharger les plongeurs.
10. Bouchez et retirez les tubes d'élution contenant de l'ARN juste après le cycle pour éviter l'évaporation des éluats. Retirez le ou les plateaux Maxwell® de l'appareil.

Remarque : pour retirer le plateau de la plateforme de l'appareil, tenez-le par les côtés. Vérifiez que les échantillons sont retirés de l'appareil avant de réaliser un protocole désinfection aux UV pour éviter d'endommager les acides nucléiques purifiés. Les échantillons d'ARN peuvent être conservés la nuit entre -30 °C et -10 °C, ou à moins de -60 °C pour un stockage de plus longue durée.

-  11. Retirez les cartouches et les plongeurs du ou des plateaux Maxwell® et mettez-les au rebut comme déchets dangereux conformément aux procédures de votre établissement. Les cartouches, plongeurs et tubes d'élution sont à usage unique. Ne réutilisez pas les cartouches Maxwell® CSC Cartridges, les plongeurs CSC/RSC ni les tubes d'élution.
- 

7. Après la purification

Déterminez si l'échantillon d'ARN purifié présente un rendement et une pureté conformes aux exigences de l'essai de diagnostic en aval avant de l'utiliser. Les performances du kit ont été évaluées en fonction de la purification de l'ARN amplifiable. Les autres moyens de quantification, y compris l'absorbance ou la fixation du colorant fluorescent, peuvent ne pas être corrélés avec l'amplification (1). Les valeurs d'absorbance pour les échantillons FFPE peuvent surestimer le rendement. Nous recommandons d'utiliser des méthodes plus spécifiques pour déterminer le rendement (1).

8. Évaluation des performances analytiques

Les performances analytiques du Maxwell® CSC RNA FFPE Kit ont été évaluées sur le Maxwell® CSC Instrument avec des échantillons FFPE recueillis à partir de tissus humains de la poitrine, des poumons et du côlon.

Par ailleurs, le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit a été évalué avec le Maxwell® CSC 48 Instrument afin de démontrer les performances équivalentes du kit sur les deux instruments.

8.A. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ARN

La quantité, la qualité et l'amplificabilité de l'ARN ont été évaluées pour des éluats préparés à partir de sections de tissus FFPE de la poitrine, des poumons et du côlon avec le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit et le Maxwell® CSC Instrument. Des échantillons (2 µl et 8 µl) de chaque éluat ont été testés dans un essai RT-qPCR ciblant un gène domestique, HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1). L'entrée d'éluat dans le RT-qPCR à 2 µl et 8 µl a été utilisée pour évaluer l'inhibition, car une différence d'entrée du simple au quadruple devrait produire une différence C_q d'environ 2 cycles. Tous les échantillons ont été amplifiés correctement aux deux volumes d'entrée.

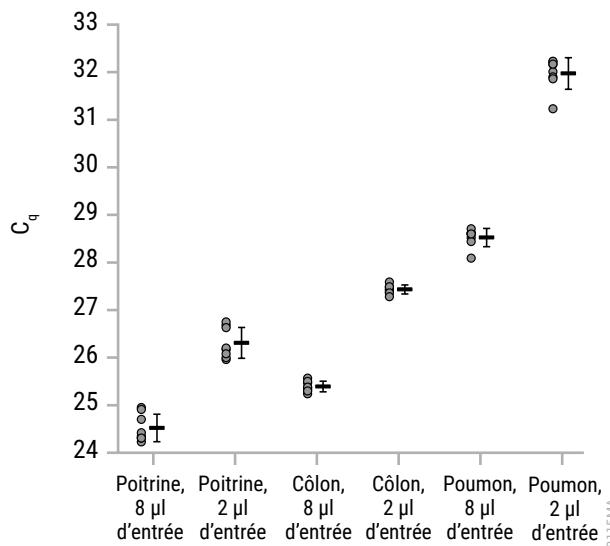


Figure 4. Valeurs RT-qPCR C_q , moyenne et écart-type pour les éluats préparés à partir de sections de tissus FFPE de la poitrine, des poumons et du côlon. Pour chaque ensemble d'échantillons, les points sur la gauche représentent des valeurs C_q d'échantillons individuels, tandis que la moyenne avec l'écart-type apparaît sur la droite.

8.B. Reproductibilité

Tableau 2. Reproductibilité entre les utilisateurs. Pour évaluer la variabilité entre les utilisateurs, des échantillons de tissus FFPE prétraités ont été regroupés puis extraits avec le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit et le Maxwell® CSC Instrument. Des éluats ont été amplifiés dans l'essai RT-qPCR ciblant le gène HPRT1 et les concentrations d'ARN ont été calculées à partir de la valeur C_q . Les moyennes et le pourcentage du coefficient de variation (% CV) pour d'ARN obtenue à partir d'éluats sur 3 utilisateurs différents et sont présentés ci-dessous.

	Concentration (ng/µl)	Écart-type (ng/µl)	% CV
Numéro de l'utilisateur	1 (n = 8)	1,47	0,123
	2 (n = 8)	1,45	0,082
	3 (n = 7)*	1,39	0,100
Moyenne de trois utilisateurs différents	1,44	0,104	7,2

*Le test des valeurs aberrantes de Dixon autorisait l'exclusion d'une répétition dans cet ensemble comme valeur aberrante au seuil de confiance de 95 %. Cette répétition a été exclue de l'analyse.

8.C. Substances interférentes (inhibition)

Tableau 3. Inhibition par des substances endogènes dans l'échantillon. Des éluats ont été préparés à partir d'échantillons de tissus FFPE de la poitrine, des poumons et du côlon avec le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit et le Maxwell® CSC Instrument. Des échantillons (2 µl et 8 µl) de chaque éluat ont été amplifiés dans un essai RT-qPCR ciblant le gène HPRT et le ΔC_q (différence entre le C_q moyen pour chaque volume d'entrée d'éluat) a été calculé. Le ΔC_q entre les entrées de 2 µl et 8 µl était compris entre 1,94 et 2,04 cycles. Un ΔC_q entre les entrées de volume de 2 cycles correspond à aucune inhibition détectable de l'amplification de l'ADN. Pour tous les tissus testés, aucune inhibition n'a été détectée.

Tissu (n = 8)	C_q pour 8 µl d'entrée (cycles)	C_q pour 2 µl d'entrée (cycles)	ΔC_q
FFPE poitrine	24,52	26,46	1,94
FFPE côlon	25,39	27,43	2,04
FFPE poumons	28,52	30,49	1,96

8.D. Contamination croisée

De l'ARN a été purifié à partir de 8 échantillons de tissus FFPE différents et de 8 échantillons témoins négatifs avec le Maxwell® CSC Instrument et le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Des cartouches Maxwell® contenant des échantillons de tissus FFPE et des cartouches Maxwell® contenant un témoin négatif (eau) ont été traités sur différentes positions de la plateforme dans le Maxwell® CSC Instrument et les éluats produits ont été testés en double par un essai RT-qPCR ciblant le HPRT1 afin de chercher une contamination de l'ARN des témoins négatifs à partir d'échantillons voisins. Aucun ARN contaminant n'a été observé dans les témoins négatifs.

9. Évaluation des performances cliniques

Les performances cliniques du Maxwell® CSC RNA FFPE Kit ont été évaluées par un laboratoire clinique externe avec des échantillons de tissus FFPE humains et le Maxwell® CSC Instrument.

9.A. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ARN

Tableau 4. Comparaison des méthodes. De l'ARN a été purifié à partir de 15 échantillons de tissus FFPE avec le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit et par la méthode d'extraction standard du laboratoire (méthode de référence du laboratoire), puis amplifié par un essai RT-qPCR ciblant le gène HPRT1 et les résultats C_q des deux méthodes ont été comparés. ARN purifié avec le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit amplifié pour tous les échantillons et avec des valeurs C_q comprises entre 25,86 et 35,35. Les éluats préparés avec la méthode de référence du laboratoire n'ont pas réalisé l'amplification correctement pour 3 des 15 échantillons testés. Les 3 éluats qui n'ont pas été amplifiés avaient des valeurs C_q supérieures à celles des éluats issus des mêmes échantillons préparés par le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit.

Échantillon de tissus FFPE	C_q moyen	
	Maxwell® CSC	Méthode de référence du laboratoire
1	29,55	33,78
2	35,35	Aucun C_q
3	25,86	31,37
4	27,75	34,49
5	32,27	Aucun C_q
6	33,02	34,49
7	32,69	Aucun 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. Reproductibilité

Tableau 5. Reproductibilité d'un testeur à l'autre. Afin de confirmer la cohérence des résultats entre les testeurs dans l'environnement typique, de l'ARN a été extrait de huit échantillons de tissus FFPE par deux testeurs différents avec Maxwell® CSC RNA FFPE Kit et le Maxwell® CSC Instrument. Les éluats obtenus ont été amplifiés avec un essai RT-qPCR ciblant le gène HPRT1 et les résultats obtenus à partir de chaque échantillon ont été comparés entre les deux testeurs.

Échantillon de tissus FFPE	C _q moyen	
	Testeur 1	Testeur 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. Contamination croisée

Afin de confirmer l'absence de contamination croisée entre échantillons dans l'environnement typique des utilisateurs, de l'ARN a été purifié à partir de 8 échantillons de tissus FFPE différents et de 8 échantillons témoins négatifs (eau) avec le Maxwell® CSC Instrument et le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. Des cartouches Maxwell® contenant des échantillons de tissus FFPE et des cartouches Maxwell® contenant le témoin négatif (eau) ont été traitées sur différentes positions de la plateforme dans le Maxwell® CSC Instrument. Des éluats d'échantillons et des éluats de témoins négatifs ont été testés en double par un essai RT-qPCR ciblant le gène HPRT1 afin de déterminer s'il y avait eu une contamination croisée des échantillons négatifs. Huit des huit échantillons négatifs ont produit des résultats négatifs, confirmant l'absence de toute contamination croisée détectable.

10. Dépannage

Pour les questions qui ne sont pas abordées ici, contactez votre succursale ou distributeur local Promega. Les coordonnées sont disponibles à l'adresse : www.promega.com. E-mail : techserv@promega.com

Symptômes

Concentration d'ARN plus basse que prévu dans l'éluat (une section FFPE devrait produire de l'ARN amplifiable en fonction de la taille des tissus, de la cellularité, de la condition de fixation de la formaline et de la manipulation.)

Causes et commentaires

Les performances du kit ont été évaluées en isolant l'ARN d'échantillons de tissus FFPE de taille comprise entre 0,1 mm³ et 2,0 mm³. Utilisez des sections sur cette plage.

Le kit a été conçu pour être utilisé avec des échantillons FFPE recueillis à partir de tissus humains de la poitrine, des poumons et du côlon. Les durées et températures d'incubation ne sont peut-être pas optimales pour d'autres types d'échantillons.

Le kit n'a pas été conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus qui ont été préparés avec d'autres fixatifs que la formaline neutre à 10 %. Confirmez qu'aucun autre fixatif n'a été utilisé.

Des RNases ont peut-être été introduits pendant le traitement ou la quantification des échantillons. Vous trouverez à la Section 11 des informations sur la création d'un environnement sans ribonucléase.

Les tissus utilisés provenaient d'une section ou glissière souillée. Nous n'accordons aucune garantie pour les sections ou glissières souillées. Réalisez à nouveau la purification avec une section ou glissière non souillée.

Les performances du kit ont été évaluées en fonction de la purification de l'ARN amplifiable. Les autres moyens de quantification, y compris l'absorbance ou la fixation du colorant fluorescent, peuvent ne pas être corrélés avec l'amplification. Utilisez une méthode de quantification de l'amplification pour évaluer le rendement.

10. Dépannage (suite)

Symptômes	Causes et commentaires
Qualité plus basse que prévu (l'éluat contient de l'ARN hautement fragmenté ou des inhibiteurs des essais ultérieurs).	La fixation de formaline et l'inversion de la réticulation associée fragmentent l'ARN. Si l'ARN est fragmenté avant l'extraction/purification, l'ARN fragmenté sera purifié avec ce kit. Recommencez avec une section adjacente pour évaluer s'il y a un problème avec la section sélectionnée ou avec le processus.
ADN présent dans les éluats (les éluats sont contaminés avec de l'ADN, ce qui peut affecter les essais ultérieurs.)	Certains essais d'amplification sont particulièrement sensibles à la présence d'inhibiteurs. Les contrôles ultérieurs devraient identifier la présence d'un inhibiteur de l'amplification dans l'éluat. L'utilisateur doit vérifier la compatibilité de ce produit avec tous les essais ultérieurs.
	Le cocktail de DNase ajouté à l'échantillon présente une activité DNase excessive lorsqu'il est utilisé avec des échantillons de tissus FFPE de taille comprise entre 0,1 mm ³ et 2,0 mm ³ . Il n'a pas été conçu pour des échantillons de taille supérieure ou inférieure et n'est peut-être pas optimal. Utilisez des sections sur cette plage.
	Un mélange insuffisant du cocktail de DNase dans l'échantillon pendant le prétraitement peut entraîner une dégradation incomplète de l'ADN. Veillez à bien mélanger le cocktail de DNase dans l'échantillon.
	Si les composants du cocktail de DNase sont ajoutés à l'échantillon séparément, veillez à les ajouter dans l'ordre indiqué à la Section 5.A, étape 10. Par ailleurs, veillez à bien mélanger chaque composant lors de son ajout. L'ajout de composants dans un autre ordre ou un mélange incomplet peut inactiver le DNase.

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif qui a entraîné, ou pourrait entraîner, le décès ou une grave blessure d'un utilisateur ou patient doit être signalé immédiatement au fabricant. Les utilisateurs installés dans l'Union Européenne devraient également signaler tout incident grave à l'Autorité Compétente de l'État Membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

11. Création d'un environnement sans ribonucléase

Les ribonucléases sont extrêmement difficiles à inactiver. Veillez à éviter d'introduire une activité RNase dans vos échantillons d'ARN pendant et après l'isolation. Ceci est particulièrement important si le produit de départ n'est disponible qu'en quantité limitée. Les remarques suivantes peuvent contribuer à éviter une contamination accidentelle de vos échantillons avec du RNase.

1. Deux des principales sources de contamination par RNase sont les mains de l'utilisateur et les bactéries ou les moisissures qui peuvent être présentes sur les particules de poussière en suspension dans l'air. Pour éviter ces sources de contamination, utilisez une technique aseptique lors de la manipulation des réactifs fournis avec ce système. Portez des gants en permanence. Changez de gants immédiatement si vous avez pu être en contact avec des ribonucléases.
2. Dès que possible, utilisez des matières plastiques stériles jetables pour manipuler l'ARN. Ces matières sont généralement exemptes de RNase et ne nécessitent pas de prétraitement pour inactiver le RNase.
3. Traitez le verre et le plastique non stériles avant de les utiliser pour garantir l'absence de RNase. Chauffez le verre à 200 °C pendant la nuit et rincez abondamment les plastiques avec 0,1 N de NaOH, 1 mM d'EDTA puis de l'eau exempte de RNase. Il est également possible d'utiliser des produits d'élimination de RNase du commerce selon les instructions du fabricant.
4. Traitez les solutions non fournies avec le système en ajoutant du pyrocarbonate de diéthyle (DEPC) à 0,1 % dans une hotte. Laissez incuber une nuit sous agitation et à température ambiante dans la hotte. Passez à l'autoclave pendant 30 minutes pour éliminer toute trace de DEPC.



Mise en garde : le DEPC est un produit cancérogène présumé et ne doit être utilisé que dans une hotte chimique. Le DEPC réagit rapidement avec les amines et ne peut pas être utilisé pour traiter les tampons Tris.

Remarque : pour toutes les applications en aval, il est essentiel de continuer à protéger vos échantillons d'ARN contre les RNases.

12. Références

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

13. Produits apparentés

Instruments et accessoires

Produit	Taille	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	1 chacun	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 chacun	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 chacun	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 chacun	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 chacun	AS8402
Microtube, 1,5 ml	1 000/pack	V1231

*Pour diagnostic in vitro. Ce produit n'est disponible que dans certains pays.

Kits de réactifs Maxwell® CSC

Visitez www.promega.com pour une liste des kits de purification Maxwell® CSC disponibles.

14. Récapitulatif des modifications

Les modifications suivantes ont été apportées lors de la révision de ce document datant de novembre 2022 :

1. La Section 3 a été renommée Destination/Usage prévu du produit.
2. Les sections 8 et 9 ont été ajoutées.
3. Le document a été mis à jour pour la conformité à la réglementation (UE) 2017/746 sur les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

^(a)Numéro de brevet américain 7 329 488 et numéro de brevet coréen 10-0483684.

© 2013–2022 Promega Corporation. Tous droits réservés.

Maxwell est une marque déposée de Promega Corporation.

LpH est une marque déposée de Steris Corporation.

Les produits peuvent être couverts par des brevets publiés ou en attente d'approbation ou peuvent présenter certaines limites. Veuillez consulter notre site Web pour plus d'informations.

Tous les prix et spécifications peuvent être modifiés sans préavis.

Les allégations concernant les produits peuvent être modifiées. Veuillez contacter Promega Technical Services ou accéder au catalogue en ligne de Promega pour bénéficier des informations les plus récentes sur les produits Promega.