

Mayo 2021

Instrucciones de uso de QIASymphony[®] PAXgene[®] Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) (manual de uso)



192

Versión 1

IVD

Para uso diagnóstico in vitro

CE

REF

768566



PreAnalytiX GmbH, Feldbachstrasse, CH - 8634
Hombrechtikon, Suiza

R1 **MAT**

1123518ES

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

Marcas comerciales: PAXgene®, PreAnalytiX® (PreAnalytiX GmbH); QIAGEN®, QIAcube®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Corning®, Falcon® (Corning, Inc.); Eppendorf® (Eppendorf AG); SpeedVac® (Thermo Fisher Scientific o sus filiales). No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc., que se utilizan en este documento no están protegidos por la ley, aunque no se indique específicamente.

Acuerdo de licencia limitada para el QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto puede utilizarse únicamente conforme a los protocolos suministrados con el producto y a este manual de uso y para su uso exclusivo con los componentes incluidos en el panel. PreAnalytiX® no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este panel con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com y www.PreAnalytiX.com.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, PreAnalytiX no garantiza que este panel ni sus usos no infrinjan derechos de terceros.
3. Este panel y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. PreAnalytiX niega específicamente cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del panel aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. PreAnalytiX se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidas las costas procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit o con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com y www.PreAnalytiX.com.

HB-2866-001 1123518 © 2021 PreAnalytiX GmbH, todos los derechos reservados.

Contenido

Uso previsto	5
Usuario previsto	5
Descripción y principio.....	6
Resumen y explicación	6
Principios del procedimiento	7
Materiales suministrados	9
Contenido del kit.....	9
Materiales necesarios pero no suministrados	10
Equipo	10
Advertencias y precauciones.....	11
Información de seguridad.....	11
Precauciones	12
Almacenamiento y manipulación de reactivos	14
Componentes del kit	14
Recogida y preparación de las muestras	16
Procedimiento	20
Descripción general: Purificación automatizada de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) en el instrumento QIAasymphony SP	20
Visión general de los protocolos	26
Protocolo: Purificación automatizada de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) en el instrumento QIAasymphony SP	29
Control de calidad.....	32
Limitaciones	33
Guía de resolución de problemas.....	34

Símbolos	37
Apéndice: Cuantificación del ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA)	39
Información para pedidos	40
Historial de revisiones del documento	43

Uso previsto

El QIAasymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD), que debe utilizarse con el instrumento QIAasymphony SP, está previsto para el aislamiento y la purificación automatizados de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) de plasma generado a partir de sangre total venosa humana recogida en el PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD).

El QIAasymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) emplea tecnología de partículas magnéticas para el aislamiento y la purificación automatizados de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) de plasma humano.

El QIAasymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) está indicado para uso diagnóstico in vitro y está concebido para que lo utilicen usuarios profesionales, como técnicos y médicos formados en técnicas de biología molecular.

Usuario previsto

Este kit se ha diseñado para uso profesional.

Solo el personal especialmente formado y cualificado en las técnicas de biología molecular y que esté familiarizado con esta tecnología puede utilizar el producto.

Descripción y principio

Resumen y explicación

El ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) suele estar presente en el plasma como fragmentos cortos (<1000 bp). La concentración de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) en plasma suele ser baja (puede oscilar entre 1 y 100 ng/ml) y varía considerablemente entre personas. El PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) de PreAnalytiX con el marcado CE junto con el QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) constituye un flujo de trabajo estandarizado para la obtención, el almacenamiento y el transporte de sangre; la estabilización de ADN en un tubo cerrado y, posteriormente, el aislamiento y la purificación de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) a partir de plasma humano utilizando el instrumento QIAGEN® QIASymphony SP.

Se proporcionan protocolos en el instrumento QIASymphony SP para la extracción de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) a partir de 2,4 y 4,8 ml de plasma generado en tubos PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) mediante centrifugación doble. El plasma se transfiere y se procesa en un tubo secundario en el instrumento QIASymphony SP.

De forma alternativa, existen protocolos para la manipulación de tubos primarios en el instrumento QIASymphony SP para volúmenes de introducción de plasma de 2,4 y 4 ml. En este caso, no es necesario un segundo paso de centrifugación ni de transferencia de plasma a un tubo secundario.

La tecnología de partículas magnéticas del QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit permite purificar ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) de alta calidad sin proteínas, nucleasas ni otras impurezas. El instrumento QIASymphony SP realiza todos los pasos del procedimiento de purificación. En una sola serie se procesan hasta 96 muestras, en lotes de 24. Para el aislamiento de ADN genómico (ADNg) a partir de la fracción celular nucleada de la sangre obtenida en los PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) con el instrumento QIASymphony SP, consulte las instrucciones que se incluyen en las instrucciones de uso de PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) (www.PreAnalytiX.com).

Principios del procedimiento

La tecnología del instrumento QIASymphony SP combina la velocidad y la eficiencia de la purificación de ácidos nucleicos basada en el intercambio aniónico con la práctica manipulación de las partículas magnéticas (figura 1). El procedimiento de purificación está diseñado para garantizar una manipulación segura y reproducible de muestras potencialmente infecciosas, y comprende 3 pasos: unión, lavado y elución (figura 2). Los usuarios pueden elegir entre distintos volúmenes de introducción de muestras.

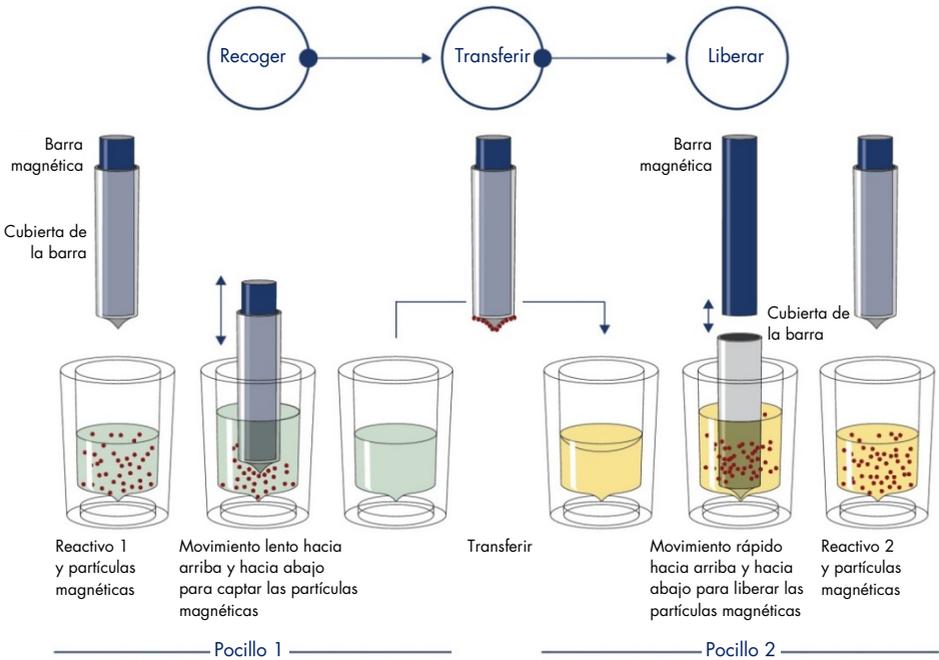


Figura 1. Diagrama esquemático del principio del instrumento QIASymphony SP. El instrumento QIASymphony SP procesa una muestra que contiene partículas magnéticas de la forma siguiente: una barra magnética protegida por una cubierta entra en un pocillo que contiene la muestra y atrae las partículas magnéticas. La cubierta de la barra magnética se sitúa encima de otro pocillo y se liberan las partículas magnéticas. Estos pasos se repiten varias veces durante el procesamiento de las muestras. El instrumento QIASymphony SP utiliza un cabezal magnético que contiene una matriz de 24 barras magnéticas, de modo que puede procesar simultáneamente un máximo de 24 muestras.

QIAasymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit

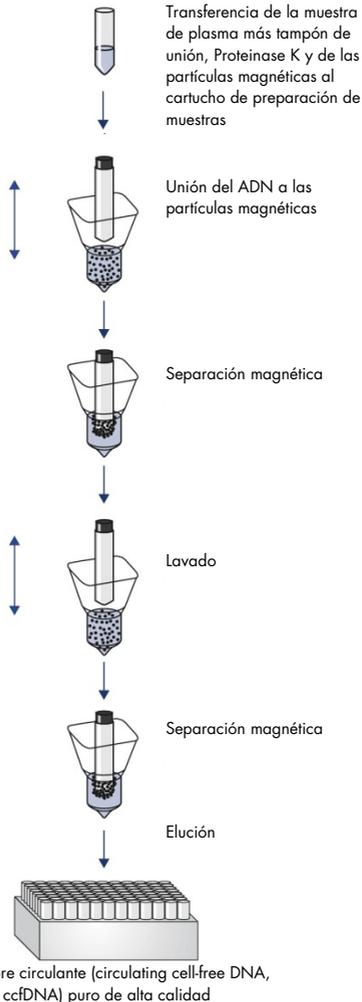


Figura 2. Pasos para la extracción de ADN circulante libre (circulating cell-free DNA, ccfDNA) con el QIAasymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD). Los fragmentos de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) se aíslan del plasma generado a partir de sangre total venosa humana recogida en el PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD). Durante el primer paso de procesamiento, la Proteinase K digiere las proteínas del plasma y el ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) se une a la superficie de las partículas magnéticas. Tres pasos de lavado garantizan la eliminación de los contaminantes. Finalmente, el ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) se eluye de las partículas magnéticas y está listo para usarse en las aplicaciones posteriores.

Materiales suministrados

Contenido del kit

Abreviatura	Denominación	Cantidad	Principios activos	Concentración [%]**
QIAAsymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) (192) N.º de catálogo 768566 Número de reacciones 192				
RC	Reagent cartridge (Cartucho de reactivos)*†	2	Detergente no iónico Partícula magnética de intercambio aniónico NaOH Etanol	≥0,5-<10 [p/p] No aplicable ≥0,05-<0,1 [p/p] ≥70-<90 [v/v]
PROTK	Proteinase K (Proteinasa K)†	5 × 10 ml	Proteinase K	≥1-<3 % [p/p]
PL	Piercing lid (Tapa de perforación)	2	—	No aplicable
RSS	Reuse Seal Set (Juego de sellado para reutilización)†	2	—	No aplicable
	Elution Microtubes CL, racked (Microtubos de elución CL, engradillados)#	2	—	No aplicable
	Caps for Elution Microtubes (Tapones para microtubos de elución)#	1 × (55 × 8)	—	No aplicable
	Instrucciones de uso (manual de uso)	1	—	No aplicable
	PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool	1	—	No aplicable

* Contiene azida sódica como conservante.

† Consulte la lista de símbolos y definiciones en la página 37.

‡ Un Reuse Seal Set contiene 8 tiras de sellado para reutilización.

También puede adquirirse por separado, consulte Información para pedidos.

** Concentración máxima en un solo pocillo.

Materiales necesarios pero no suministrados

Al trabajar con productos químicos y muestras biológicas, siga siempre las precauciones universales y utilice una bata de laboratorio adecuada, así como guantes desechables y gafas de protección conforme a las políticas y los procedimientos de su centro. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

Asegúrese de que los instrumentos se hayan verificado y calibrado siguiendo las recomendaciones del fabricante.

- Sample Prep Cartridges, 8-well (QIAGEN, n.º de catálogo 997002)
- 8-Rod Covers (QIAGEN, n.º de catálogo 997004)
- Filter-Tips 200 µl y 1500 µl (QIAGEN, n.º de catálogo 990332 y 997024, respectivamente)
- Tip Disposal Bags (n.º de catálogo 9013395)
- PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) (PreAnalytiX, n.º de catálogo 768165)
- Tubos de muestras. Para ver los formatos compatibles de los tubos de muestras primarios y secundarios, consulte la lista de materiales de laboratorio que encontrará en la pestaña Product Resources (Recursos del producto) de la página de productos en www.qiagen.com.
- Para ver formatos compatibles de los tubos de elución, consulte la lista de materiales de laboratorio que encontrará en la pestaña Product Resources (Recursos del producto) de la página de productos en www.qiagen.com.

Equipo *

- Pipeta (5 ml)
- Instrumento QIASymphony SP (QIAGEN, n.º de catálogo 9001297)

* Antes de usar el producto, asegúrese de que los instrumentos se hayan verificado y calibrado siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico in vitro

Lea atentamente todas las instrucciones antes de utilizar el kit.

Para usuarios de la Unión Europea: Tenga en cuenta que debe comunicar los incidentes graves que hayan ocurrido en relación con el dispositivo al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que el usuario o el paciente esté establecido.

Información de seguridad

Al trabajar con productos químicos y muestras biológicas, siga siempre las precauciones universales y utilice una bata de laboratorio adecuada, así como guantes desechables y gafas de protección conforme a las políticas y los procedimientos de su centro. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las SDS de todos los kits y componentes de los kits de PreAnalytiX.

- Todos los materiales químicos y biológicos son potencialmente peligrosos. Los materiales de muestra son material potencialmente infeccioso y deben tratarse como material biopeligroso.
- Deseche los residuos de muestras y ensayos conforme a los procedimientos de seguridad local.

Precauciones

Los tampones en el cartucho de reactivos (RC) contienen azida sódica. Si se derrama tampones de los kit, límpielos con un detergente de laboratorio adecuado y agua. Si el líquido derramado contiene agentes potencialmente infecciosos, limpie primero la zona afectada con agua y detergente de laboratorio y, a continuación, con hipoclorito sódico al 1 % (v/v)(lejía).

Las siguientes frases relativas a los riesgos y a las medidas de precaución son aplicables a los componentes del QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit.

MBS3

Contiene: Azida sódica. ¡Advertencia! Puede ser nocivo por ingestión. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara.

Proteinase K



Contiene: Proteinase K. ¡Peligro! Causa irritación leve de la piel. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara. Llevar equipo de protección respiratoria. En caso de exposición manifiesta o presunta: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico. Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar.

QSE2



Contiene: Hidróxido de sodio. ¡Peligro! Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado. En caso de contacto con los ojos: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. En caso de contacto con la piel (o el cabello): Quítense inmediatamente la ropa manchada o salpicada. Lávese la piel con agua o dúchese. Llamar inmediatamente a un centro de toxicología o a un médico. Consérvase bajo llave. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara.

QSW9



Contiene: Etanol. ¡Peligro! Líquido y vapor fácilmente inflamables. Provoca irritación ocular grave. Conservar alejado del calor, chispas, llamas abiertas y superficies calientes. No fumar. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

El QIAAsymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) debe conservarse en posición vertical a temperatura ambiente (15-25 °C). Las partículas magnéticas de los cartuchos de reactivos (RC) mantienen su actividad cuando se conservan dentro de este intervalo de temperatura.

Nota: En la etiqueta de la caja del QIAAsymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) figura la fecha de caducidad del kit. La fecha de caducidad es del cartucho de reactivos.

No utilice el QIAAsymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) si ha caducado.

Componentes del kit

El QIAAsymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) contiene solución de Proteinase K lista para usar que puede conservarse a temperatura ambiente (15-25 °C).

No conserve los cartuchos de reactivos (RC) a temperaturas inferiores a 15 °C.

Los cartuchos de reactivos (RC) del QIAAsymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) abiertos pueden conservarse a temperatura ambiente (15-25 °C) durante un máximo de 4 semanas, lo que permite una reutilización rentable de los reactivos y un procesamiento más flexible de las muestras. Si utiliza parcialmente un cartucho de reactivos (RC), vuelva a colocar la cubierta del recipiente que contiene las partículas magnéticas y selle el cartucho de reactivos (RC) con las tiras de sellado para reutilización suministradas inmediatamente después de finalizar la serie del protocolo para evitar la evaporación.

Para evitar la evaporación de reactivos, el cartucho de reactivos (RC) debe estar abierto durante un máximo de 15 horas (incluidos los tiempos de procesamiento) a una temperatura ambiente máxima de 32 °C. El almacenamiento incorrecto de los componentes del kit puede acelerar el envejecimiento de los tampones.

El procesamiento de lotes con números de muestras bajos (<24) aumentará el tiempo que permanece abierto el cartucho de reactivos (RC) y los volúmenes de tampón necesarios, lo que reducirá potencialmente el número total posible de preparaciones de muestras por cartucho.

Evite la exposición de los cartuchos de reactivos (RC) a la luz UV (p. ej., utilizada para la descontaminación), ya que dicha exposición puede causar un envejecimiento acelerado de los cartuchos de reactivos (RC) y de los tampones.

Debe prestarse atención a las fechas de caducidad y a las condiciones de conservación que aparecen impresas en la caja y en las etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados o mal almacenados.

Recogida y preparación de las muestras

El procedimiento de purificación está optimizado para su uso con plasma generado a partir de sangre recogida en los PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD). Para obtener información sobre la recogida de sangre, la manipulación de estos tubos y la preparación del plasma, consulte las instrucciones de uso del PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) que encontrará en las pestañas Product Resource (Recursos del producto) y en las pestañas Resources (Recursos) de las páginas de productos en www.qiagen.com y www.PreAnalytiX.com, respectivamente.

La preparación del plasma puede llevarse a cabo con (A) el protocolo de doble centrifugación estándar o (B) a través de la manipulación del tubo primario: procesamiento directo de los PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) centrifugados una sola vez en el instrumento QIASymphony SP.

A) Preparación de plasma a partir de sangre para protocolos estándar

1. Centrifugue el PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 15 min a 1600-3000 × g (primera centrifugación) y durante 10 min a 1600-3000 × g (segunda centrifugación) con una centrifugadora de cubo basculante equilibrada. Si se prefiere el frenado, se recomienda usar un frenado de nivel medio que debe estar validado para el flujo de trabajo específico.

Nota: Para obtener un rendimiento óptimo de las muestras que se conservan refrigeradas antes de la centrifugación, espere a que los tubos recuperen la temperatura ambiente antes de procesarlos.

2. Pipetee el plasma en un tubo de centrifugadora de fondo cónico de 15 ml (no suministrado), asegurándose de no alterar la fracción celular nucleada.
3. Centrifugue el tubo de centrifugadora de fondo cónico de 15 ml a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 15 min a 1600-3000 × g (primera centrifugación) y durante 10 min a 1600-3000 × g (segunda centrifugación) con una centrifugadora equilibrada.

Nota: No supere la velocidad de centrifugación máxima del tubo secundario recomendada por el fabricante.

4. Pipetee el volumen de plasma necesario (consulte la sección "Volumen de muestra" en la página 20) en un tubo de poliestireno de fondo redondeado de 14 ml, 17 × 100 mm y asegúrese de no alterar el sedimento celular de la sangre residual, si lo hubiera.
5. Transfiera el tubo de fondo redondeado con la muestra de plasma al portatubos y cargue el portatubos en el cajón de entrada de muestras del instrumento QIASymphony SP.

Nota: Para obtener el máximo rendimiento del ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA), procese el volumen máximo de plasma disponible.

Nota: Evite la formación de espuma en el interior o en la superficie de las muestras de plasma. La espuma o las burbujas de aire en las muestras pueden provocar el pipeteado de un volumen de muestra incorrecto.

Nota: Tras la extracción y centrifugación de la sangre, los PAXgene Blood ccfDNA Tubes (IVD) estabilizan el ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) (perfil de ccfDNA) en el plasma a 2-8 °C durante un máximo de 7 días antes del procesamiento del plasma. Para períodos de conservación más largos, recomendamos congelar partes alícuotas.

Nota: Si se utilizan muestras de plasma previamente almacenadas (p. ej., conservadas a 2-8 °C o congeladas a -20 o -70 °C/-80 °C), estas deben equilibrarse a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de comenzar la serie.

B) Preparación de plasma de sangre para la manipulación del tubo primario en el instrumento QIASymphony SP

1. Centrifugue el PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 15 min a 3000 × g con una centrifugadora de cubo basculante equilibrada. Si se prefiere el frenado, se recomienda usar un frenado de nivel medio que debe estar validado para el flujo de trabajo específico.

Nota: Para obtener un rendimiento óptimo de las muestras que se conservan refrigeradas antes de la centrifugación, espere a que los tubos recuperen la temperatura ambiente antes de procesarlos.

2. Cuantifique el volumen de plasma en cada tubo tras retirarlo del cubo de la centrifugadora con la herramienta PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool suministrada como contenido del kit (figura 3). Al retirar el tubo de la centrifugadora, la flecha de color verde azulado en la herramienta está alineada con el punto de contacto entre el plasma y la célula. Las líneas azules indican si el nivel de plasma es suficiente para el protocolo de manipulación de tubos primarios de 2,4 o 4,0 ml. Se necesita una altura de columna de plasma mínima de 2,3 cm para el protocolo de 2,4 ml y un mínimo de 3,4 cm, para el protocolo de 4,0 ml.



Determine el protocolo óptimo para procesar los PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) directamente en el instrumento QIASymphony SP

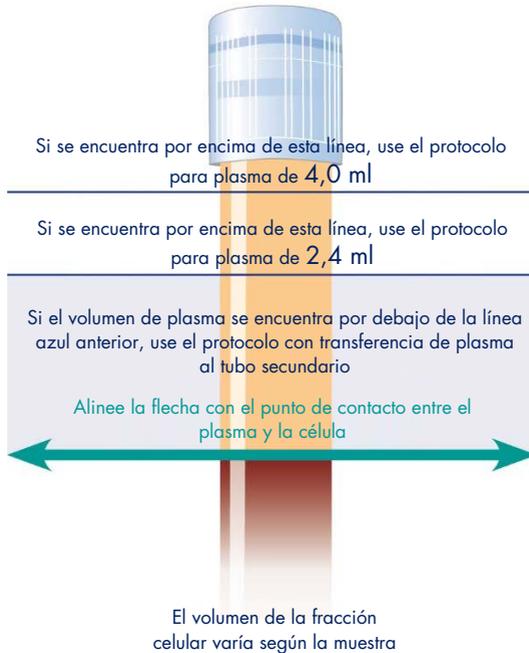


Figura 3. Determinación del volumen de plasma con la herramienta PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool (esto solo tiene fines ilustrativos, no lo imprima porque el tamaño real varía, no debe usarse con las muestras).

Nota: En caso de que no se haya producido una separación clara entre el plasma y la fracción celular o que las fases se hayan mezclado accidentalmente al retirarlas de la centrifugadora, debe repetirse la centrifugación.

3. Retire el Hemogard Closure Cap de los PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) antes de colocarlos en el instrumento QIAasymphony SP para una extracción directa de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA).

Nota: Deben extremarse las precauciones al quitar los cierres de los tubos y manipular tubos abiertos para reducir el posible riesgo de derramamiento de las muestras, contaminación cruzada entre los tubos y exposición a la sangre.

4. Coloque los PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) abiertos que contienen suficiente plasma en el portatubos y cargue el portatubos en el cajón de entrada de muestras del instrumento QIAasymphony SP.

C) Congelación y descongelación de las muestras de plasma procesadas en el PAXgene Blood ccfDNA Tube

1. Para la congelación, transfiera el plasma a tubos adecuados (p. ej., crioviales) colocados en una gradilla apropiada.
2. Congele el plasma y consérvelo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para un almacenamiento a menos de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, primero congele las muestras de plasma a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 24 h y luego transfíralas a una temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Descongele el plasma a temperatura ambiente ($15\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Nota: No descongele a bajas temperaturas (p. ej., $4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4. Si se forman crioprecipitados en el plasma, agite el tubo en vórtex durante 30 s tras descongelarlo y utilice la muestra para el procedimiento de aislamiento del ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) en el instrumento QIAasymphony SP.

Nota: No se recomienda centrifugar el plasma para eliminar los crioprecipitados porque pueden contener ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA).

Nota: Para evitar la formación de crioprecipitados, el plasma puede descongelarse a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min en lugar de a la temperatura ambiente.

Procedimiento

Descripción general: Purificación automatizada de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) en el instrumento QIASymphony SP

El instrumento QIASymphony SP facilita y simplifica la preparación automatizada de muestras. Las muestras, reactivos y consumibles, así como los eluidos, están separados en cajones diferentes. Basta con cargar en el cajón adecuado las muestras, los reactivos suministrados en cartuchos especiales y los consumibles preengradillados antes de iniciar una serie. Inicie el protocolo y retire el ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) purificado del cajón "Eluate" (Eluidos) una vez finalizado el procesamiento. Consulte los manuales del usuario suministrados con el instrumento para conocer las instrucciones de funcionamiento.

Nota: El mantenimiento opcional no es obligatorio para el funcionamiento del instrumento, pero es muy recomendable para reducir el riesgo de contaminación.

Volumen de muestra

Para asegurarse de que, en el flujo de trabajo habitual, el instrumento transfiera 2,4 ml de muestra (protocolo PAXcircDNA_2400) y 4,8 ml de muestra (protocolo PAXcircDNA_4800), se requiere un volumen de vacío de 0,4 y 0,5 ml, respectivamente, lo que significa que debe proporcionarse un volumen de introducción de muestra de 2,8 y 5,3 ml como mínimo. Si los volúmenes de plasma disponibles son inferiores a 2,8 o 5,3 ml, el modo Less Sample (Muestra menor), una función integrada del protocolo, permite de forma automática transferir volúmenes de plasma inferiores a los mencionados. En este caso, el instrumento transfiere una cantidad menor de muestra y el volumen transferido se documenta en el archivo de resultados. Además, las respectivas muestras se marcan como dudosa (código de error 140043, modo Enable Less Sample [Habilitar muestra menor]). Los volúmenes de entrada de plasma mínimos para habilitar el modo Less Sample (Muestra menor) son 1,6 y 4,1 ml. Las muestras no se procesarán y se marcarán como no válida si se proporciona menos volumen de muestra.

Para el flujo de trabajo de manipulación de tubos primarios, el volumen de muestra adecuado se garantiza mediante el uso de la herramienta PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool que se suministra como contenido del kit (se describe en “Preparación del material de muestra” en la página 25).

Carga de los cartuchos de reactivos (RC) en el cajón “Reagents and Consumables” (Reactivos y consumibles)

Los reactivos empleados en la purificación de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) se encuentran en un innovador cartucho de reactivos (RC) (figura 4). Cada recipiente del cartucho de reactivos (RC) contiene un reactivo concreto, como partículas magnéticas, tampón de unión, tampón de lavado o tampón de elución. Los cartuchos de reactivos (RC) parcialmente usados pueden volver a cerrarse con las tiras de sellado para reutilización para un uso posterior, lo que evita la generación de residuos debida a restos de reactivos al final del procedimiento de purificación.



Figura 4. Cartucho de reactivos (RC) del instrumento QIASymphony. El cartucho de reactivos (RC) contiene todos los reactivos necesarios para la ejecución del protocolo.

Antes de comenzar el procedimiento, asegúrese de que las partículas magnéticas están completamente en suspensión. Retire el recipiente de partículas magnéticas del bastidor del cartucho de reactivos (RC), mézclelo enérgicamente mediante agitación vorticial durante al menos 3 min y vuelva a colocarlo en el bastidor del cartucho de reactivos (RC) antes del primer uso.

Nota: Las partículas magnéticas pueden cambiar el color. Esto no afecta al rendimiento.

Coloque el cartucho de reactivos (RC) en su soporte. Antes de utilizar un cartucho de reactivos (RC) por primera vez, coloque la tapa de perforación encima del cartucho de reactivos (RC) (figura 4).

Nota: La tapa de perforación es afilada. Tenga cuidado al colocarla en el cartucho de reactivos (RC). Asegúrese de situar la tapa de perforación correctamente orientada sobre el cartucho de reactivos (RC).

Una vez retirada la cubierta del recipiente de partículas magnéticas, se carga el cartucho de reactivos (RC) en el cajón "Reagents and Consumables" (Reactivos y consumibles).

Los cartuchos de reactivos (RC) parcialmente usados pueden almacenarse hasta que vuelvan a necesitarse (consulte "Almacenamiento y manipulación de reactivos" en la página 14).

Nota: Debe añadirse Proteinase K (consulte "Antes de comenzar" en la página 27).

Nota: Asegúrese de que los cartuchos de reactivos (RC), los recipientes de partículas magnéticas y los frascos de Proteinase K no se intercambien entre diferentes lotes del kit.

Carga del material de plástico en el cajón “Reagents and Consumables” (Reactivos y consumibles)

Se carga en el cajón “Reagents and Consumables” el siguiente material: cartuchos de preparación de muestras, 8-Rod Covers (ambos preengradillados en cajas unitarias) y puntas con filtro desechables (puntas de 200 µl suministradas en gradillas azules, puntas de 1500 µl suministradas en gradillas negras).

Nota: Asegúrese de retirar las cubiertas de las cajas unitarias antes de cargar las cajas unitarias en el cajón “Reagents and Consumables” (Reactivos y consumibles).

Nota: Las puntas tienen filtros que ayudan a prevenir la contaminación cruzada.

Las ranuras para gradillas de puntas de la mesa de trabajo del instrumento QIASymphony SP aceptan cualquiera de los dos tipos de gradilla de puntas. El instrumento QIASymphony SP identificará el tipo de puntas cargadas durante el examen de inventario.

Nota: No vuelva a llenar las gradillas de puntas ni las cajas unitarias para los cartuchos de preparación de muestras o para las 8-Rod Covers antes de iniciar otra serie del protocolo. El instrumento QIASymphony SP puede utilizar cajas unitarias y gradillas de puntas parcialmente usadas.

Si desea obtener información para pedidos de material de plástico, consulte la página 40.

Carga del cajón “Waste” (Desechos)

Los cartuchos de preparación de muestras y las 8-Rod Covers utilizados durante una serie se vuelven a engradillar en cajas unitarias vacías en el cajón “Waste” (Desechos). Asegúrese de que el cajón “Waste” (Desechos) contenga suficientes cajas unitarias vacías para el material de plástico de desecho que se genera durante la serie del protocolo.

Nota: Asegúrese de retirar las cubiertas de las cajas unitarias antes de cargar las cajas unitarias en el cajón “Waste” (Residuos). Si utiliza cajas de 8-Rod Covers para la recogida de cartuchos de preparación de muestras y 8-Rod Covers usados, asegúrese de haber retirado el separador de cajas.

Debe acoplarse a la parte anterior del cajón “Waste” (Desechos) una bolsa para las puntas con filtro usadas.

Nota: El sistema no comprueba si hay una bolsa para la eliminación de puntas. Asegúrese de que la bolsa para la eliminación de puntas esté correctamente acoplada antes de iniciar una serie del protocolo. Si desea obtener más información, consulte los manuales del usuario suministrados con el instrumento. Vacíe la bolsa para puntas después de procesar un máximo de 96 muestras para evitar un atasco de puntas.

Un recipiente para desechos recoge los desechos líquidos generados durante el procedimiento de purificación. El cajón “Waste” (Desechos) solamente puede cerrarse si el recipiente para desechos está colocado en su posición. Elimine los desechos líquidos de conformidad con la normativa local en materia de seguridad y medio ambiente. No esterilice en autoclave el frasco de desechos lleno. Vacíe el frasco de desechos después de procesar un máximo de 96 muestras.

Carga del cajón “Eluate” (Eluidos)

Cargue la gradilla de elución correspondiente en el cajón “Eluate” (Eluidos). Dado que la conservación a largo plazo de eluidos en el cajón “Eluate” (Eluidos) puede dar lugar a la evaporación o condensación, se debe utilizar la posición de refrigeración. Utilice solo la ranura “Elution slot 1” (Ranura de elución 1) con el adaptador de refrigeración correspondiente.

Volumen de elución seleccionado (µl)*	Volumen de elución inicial (µl)†
60	75

* Este es el volumen accesible mínimo de eluido en el tubo de elución final para la QIAGEN EMT rack (n.º de cat. 19588) y 1.5 ml Sarstedt screw cap tubes (n.º de cat. 72.607). En casos individuales, el volumen de eluido final para determinadas muestras puede ser hasta 5 µl menor.

† Volumen inicial de tampón de elución necesario para garantizar que el volumen real de eluido sea el mismo que el volumen seleccionado.

Examen de inventario

Antes de comenzar una serie, el instrumento comprueba que se hayan cargado en los cajones correspondientes consumibles suficientes para los lotes en cola.

Preparación del material de muestra

Consulte "Recogida y preparación de las muestras", en la página 16.

Almacenamiento de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA)

Tras la preparación de las muestras, los eluidos de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) pueden almacenarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los eluidos congelados no deben descongelarse más de tres veces. Para obtener la información más reciente sobre la estabilidad del ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) en los eluidos, consulte la página del producto en www.qiagen.com o www.PreAnalytiX.com.

Visión general de los protocolos

Tabla 1. Visión general de los protocolos

Muestra	Procesamiento del PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD)	Volumen de entrada de la muestra (incluido el volumen de vacío) (ml)	Volumen de la muestra utilizado en la extracción de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) (ml)	Volumen de elución (µl)	Protocolo del instrumento QIAasymphony SP	
Plasma generado a partir de sangre total venosa humana recogida en PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD)	Centrifugación doble, transferencia de plasma a un tubo secundario	2,8	2,4	60	PAXcircDNA_2400	
		5,3	4,8	60	PAXcircDNA_4800	
	1 centrifugación, procesamiento directo en el instrumento QIAasymphony SP	Según la herramienta de selección		2,4	60	PAXcircDNA PrimaryTube_2400
				4,0	60	PAXcircDNA PrimaryTube_4000

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Siempre que trabaje con productos químicos y muestras biológicas, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Si desea obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes.
- Asegúrese de que sabe manejar bien el instrumento QIAasymphony SP. Consulte los manuales del usuario suministrados con el instrumento para conocer las instrucciones de funcionamiento.
- Antes de comenzar el procedimiento, lea el apartado “Principios del procedimiento”.
- Asegúrese de que está familiarizado con la hoja del protocolo y la lista de materiales de laboratorio (los encontrará en la pestaña Product Resources [Recursos del producto] de la página de productos en www.qiagen.com).
- Evite agitar de manera enérgica el cartucho de reactivos (RC), ya que podría formarse espuma, lo cual puede provocar problemas para la detección del nivel de líquido.

- La sangre debe recogerse en PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD; PreAnalytiX, n.º de cat. 768165). Para ver instrucciones sobre la recogida y manipulación de sangre y el procesamiento de plasma, consulte las instrucciones de uso que encontrará en la pestaña Product Resources (Recursos del producto) y en la pestaña Resources (Recursos) de la página de productos en www.qiagen.com o www.PreAnalytiX.com, respectivamente.

Antes de comenzar

- Antes de comenzar el procedimiento, asegúrese de que las partículas magnéticas están completamente en suspensión. Mezcle enérgicamente mediante agitación vorticial el recipiente que contiene las partículas magnéticas durante al menos 3 min antes del primer uso.
- Asegúrese de que la tapa de perforación está colocada sobre el cartucho de reactivos (RC) y de que la tapa del recipiente de partículas magnéticas se ha retirado o, si se está utilizando un cartucho de reactivos (RC) parcialmente usado, asegúrese de que se han retirado las tiras de sellado para reutilización.
- La Proteinase K no está incluida en el cartucho de reactivos (RC) y debe proporcionarla el usuario (cajón de muestras, ranura A, posiciones 1 o 2). Asegúrese de que se disponga del volumen correcto de Proteinase K.

El QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) contiene solución de Proteinase K lista para usar. La Proteinase K puede conservarse a temperatura ambiente (15-25 °C). Para conservación durante períodos de tiempo prolongados, le sugerimos mantener los viales de enzimas con Proteinase K a una temperatura de 2-8 °C.

Número de muestras	PAXcircDNA_2400/PAXcircDNA PrimaryTube_2400*	PAXcircDNA_4800/PAXcircDNA PrimaryTube_4000*
8	1980 µl	2860 µl
24	3740 µl	6380 µl
48	6380 µl	11.660 µl†
96	11.660 µl†	23.320 µl†

* Para cada muestra se requieren 110 µl (para 2400 µl de plasma) o 220 µl (para 4800/4000 µl de plasma) más un volumen vacío adicional de 1100 µl [(n × 110 o 220 µl) + 1100 µl].

† Si se necesitan más de 11.660 µl, use un segundo tubo (Corning, n.º de cat. 352051). Para el segundo tubo se requiere un volumen vacío adicional de 1100 µl.

Nota: Se colocan tubos que contienen Proteinase K en un portatubos. El portatubos que contiene la Proteinase K debe colocarse en las posiciones 1 y 2 en la ranura A del cajón "Sample" (Muestras). Recomendamos el uso de tubos de muestra de poliestireno de 14 ml, 17 × 100 mm y fondo redondeado (Corning, n.º de cat. 352051) para Proteinase K.

- Si las muestras tienen códigos de barras, colóquelas en el transportador de tubos de modo que los códigos estén orientados hacia el lector de códigos de barras situado en la parte izquierda del instrumento QIASymphony SP.
- Para información sobre volúmenes de muestra mínimos para tubos secundarios, consulte la lista de materiales de laboratorio correspondiente que encontrará en la pestaña Product Resources (Recursos del producto) de la página de productos en www.qiagen.com.

Protocolo: Purificación automatizada de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) en el instrumento QIASymphony SP

Se proporciona información detallada para cada protocolo, incluidos los volúmenes y tubos, en la hoja del protocolo y la lista de materiales de laboratorio que encontrará en la pestaña Product Resources (Recursos del producto) de la página de productos en www.qiagen.com. Para la preparación del material de muestra (plasma generado a partir de sangre total venosa humana recogida en el PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD)), consulte los apartados “Recogida y preparación de las muestras” y “Preparación del material de muestra” en este manual de uso, así como las instrucciones de uso del tubo que encontrará en la pestaña Product Resources (Recursos del producto) y en la pestaña Resources (Recursos) de la página de productos en www.qiagen.com o www.PreAnalytiX.com, respectivamente.

1. Cierre todos los cajones y la tapa.
2. Encienda el instrumento QIASymphony SP y espere hasta que aparezca la pantalla Sample Preparation (Preparación de muestras) y haya finalizado el procedimiento de inicialización.
3. El interruptor de alimentación se encuentra en la esquina inferior izquierda del instrumento QIASymphony SP.
4. Inicie sesión en el instrumento.

Cargue la gradilla de elución correspondiente en el cajón “Eluate” (Eluidos).

No cargue una placa de 96 pocillos en la ranura “Elution slot 4” (Ranura de elución 4). Debe utilizarse la ranura “Elution slot 1” (Ranura de elución 1) con el adaptador de refrigeración correspondiente.

Si utiliza una placa de 96 pocillos, asegúrese de que esté correctamente orientada, ya que, de lo contrario, se podrían mezclar las muestras en fases posteriores del análisis.

Si utiliza la gradilla Elution Microtubes CL, quite el fondo girando la gradilla hasta que se suelte el fondo.

5. Asegúrese de que el cajón "Waste" (Residuos) está correctamente preparado y, a continuación, realice un examen de inventario de dicho cajón, incluidos el conducto para puntas, la estación de almacenamiento de puntas, el recipiente de desechos líquidos vacío y cajas unitarias vacías. En caso necesario, sustituya la bolsa para la eliminación de puntas.
6. Cargue los cartuchos de reactivo (RC) y los consumibles necesarios en el cajón "Reagents and Consumables" (Reactivos y consumibles).
7. Realice un examen de inventario del cajón "Reagents and Consumables" (Reactivos y consumibles).
8. Coloque las muestras en el soporte para muestras adecuado y cárguelas en el cajón "Sample" (Muestras).

Nota: Además del procesamiento regular que incluye la transferencia de plasma a un soporte para muestras adecuado (14 ml Falcon® polystyrene round-bottom tube 17 x 100 mm), el flujo de trabajo de manipulación de tubos primarios de PAXgene Blood ccfDNA Tube permite extraer ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) directamente del PAXgene Blood ccfDNA Tube (10 ml PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD), 16 x 100 mm). Para obtener más información sobre la manipulación de tubos primarios, consulte la hoja del protocolo, la lista de materiales de laboratorio y las instrucciones de uso del tubo que encontrará en la pestaña Product Resources (Recursos del producto) y en la pestaña Resources (Recursos) de la página de productos en www.qiagen.com o www.PreAnalytiX.com, respectivamente.

9. Mediante la pantalla táctil, introduzca la información requerida para cada lote de muestras y para la Proteinase K que se vaya a procesar.

Introduzca la siguiente información:

- Información sobre la muestra (en función de las gradillas de muestras utilizadas, seleccione BD #352051 FalconPP 17 x 100 o BD_#768165 PAXgene ccfDNA 16 x 100)
- Protocolo que se vaya a ejecutar (Assay Control Set) (Juego de controles de ensayo).
- Volumen de elución y posición de salida.

Una vez introducida la información sobre el lote, el estado cambia de LOADED (Cargado) a QUEUED (En cola). Cuando un lote está en cola, aparece el botón Run (Ejecutar).

10. Coloque la Proteinase K en el soporte para muestras adecuado en la posición 1 o 2 y cárguela en la ranura A del cajón "Sample" (Muestras).

11. Defina la Proteinase K pulsando el botón IC.

12. Pulse el botón Run (Ejecutar) para comenzar el procedimiento de purificación.

Todos los pasos del procesamiento están totalmente automatizados. Al finalizar la serie del protocolo, el estado del lote cambia de RUNNING (En procesamiento) a COMPLETED (Finalizado).

13. Retire la gradilla de elución que contiene el ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) purificado del cajón "Eluate" (Eluidos). Confirme que se ha retirado la gradilla de elución con el software del instrumento QIASymphony SP.

14. El ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) está listo para usarse o puede almacenarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de 6 meses.

QIAGEN recomienda retirar la placa de eluidos del cajón "Eluate" (Eluidos) nada más finalizar la serie. Dependiendo de la temperatura y de la humedad, las placas de elución dejadas en el instrumento QIASymphony SP una vez finalizada la serie pueden experimentar condensación o evaporación.

Nota: Puede utilizarse la función de refrigeración de las series durante la noche del instrumento QIASymphony SP.

En general, las partículas magnéticas no se transfieren a los eluidos. Si se produce este arrastre, las partículas magnéticas presentes en los eluidos no afectarán a la mayoría de las aplicaciones posteriores.

Si es necesario retirar las partículas magnéticas antes de realizar las aplicaciones posteriores, en primer lugar los tubos o las placas que contienen los eluidos deben colocarse en un imán adecuado y, a continuación, los eluidos deben transferirse a un tubo limpio (consulte "Apéndice: Cuantificación del ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA)").

Se generan archivos de resultados para cada placa de elución.

15. Si utiliza un cartucho de reactivos (RC) solo parcialmente, s ello inmediatamente con las tiras de sellado para reutilización suministradas después de finalizar la ejecución del protocolo para evitar la evaporación.

Nota: Para obtener más información sobre el almacenamiento de cartuchos de reactivos (RC) parcialmente usados, consulte "Almacenamiento y manipulación de reactivos".

16. Elimine los tubos de muestras usados y el material de desecho de conformidad con la normativa local en materia de seguridad.

Para obtener información de seguridad, consulte el apartado "Advertencias y precauciones".

17. Limpie el instrumento QIAAsymphony SP.

Siga las instrucciones de mantenimiento indicadas en los manuales del usuario suministrados con el instrumento. Asegúrese de limpiar la protección de las puntas periódicamente para minimizar el riesgo de contaminación cruzada.

18. Cierre los cajones del instrumento y apague el instrumento QIAAsymphony SP.

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote de QIAAsymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

Limitaciones

Se ha establecido el rendimiento del sistema en estudios de evaluación del rendimiento mediante la purificación de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) de plasma generado a partir de sangre total venosa humana recogida en el PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD).

Se han determinado las características del rendimiento del QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) con fragmentos de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) ribosómico 18S y cromosómico Y DYS14 en plasma.

Es responsabilidad del usuario verificar el rendimiento del sistema para cualquier procedimiento utilizado en su laboratorio que no esté cubierto por los estudios de evaluación del rendimiento de QIAGEN y PreAnalytiX.

Para reducir al mínimo el riesgo de que se produzcan efectos negativos sobre los resultados diagnósticos, deben utilizarse controles apropiados para las aplicaciones posteriores. Todo resultado diagnóstico que se genere debe interpretarse en combinación con otros datos clínicos o de laboratorio.

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver los problemas que puedan surgir. Para obtener información de contacto y consultar una lista de las preguntas frecuentes, visite la página del producto correspondiente en www.PreAnalytiX.com o www.qiagen.com.

Comentarios y sugerencias

Manipulación general

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Aparece un mensaje de error en la pantalla táctil | Si aparece un mensaje de error durante un protocolo, consulte los manuales del usuario suministrados con el instrumento. |
| b) | Diferencias en el volumen de eluido después de las series durante la noche | Para optimizar la producción, el QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) admite el procesamiento de muestras durante la noche mediante la refrigeración de los eluidos en el instrumento QIASymphony SP. Durante largos períodos de refrigeración, los volúmenes de eluido pueden variar en función de la temperatura y la humedad en el laboratorio. Por ejemplo, si el volumen seleccionado era de 60 µl a 15-25 °C con una humedad de 30-60 %, el volumen puede estar en el intervalo de 50-85 µl después de un almacenamiento de 12 horas en el instrumento. |

Hay crioprecipitados después de descongelar las muestras de plasma

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Se forman crioprecipitados en el plasma | Para evitar que se formen crioprecipitados, el plasma puede descongelarse a 30 °C durante 30 minutos en lugar de a temperatura ambiente. No descongele a temperaturas inferiores (p. ej. 4 °C). Agite el tubo en vórtex durante 30 segundos después de descongelarlo. |
| b) | Baja cantidad obtenida de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) a partir del plasma después de eliminar los crioprecipitados | No centrifugue el plasma para eliminar los crioprecipitados porque pueden contener ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA). |

Volumen de plasma insuficiente de los tubos PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD)

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Se han recogido menos de 10 ml de sangre en el tubo PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) | Asegúrese de que se recogen 10 ml de sangre en el tubo PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD). Consulte las instrucciones de uso del tubo PAXgene Blood ccfDNA Tube. |
| b) | Fracción celular elevada | Un nivel elevado de fracción celular (hematocrito) en sangre total humana (p. ej., por encima del 51 % en varones o el 47 % en mujeres) puede dar lugar a una reducción de los volúmenes de plasma. |
| c) | Baja cantidad obtenida de plasma tras la centrifugación | Un almacenamiento de la sangre o tiempos de transporte prolongados, o condiciones de centrifugación distintas de las especificadas, pueden afectar a las cantidades que se obtienen de plasma. |

Precipitado en el recipiente de un cartucho de reactivos (RC) abierto en el QIAAsymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD)

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Evaporación de los tampones | Un exceso de evaporación puede provocar un aumento de la concentración de sal en los tampones. Deseche el cartucho de reactivos (RC). Asegúrese de sellar los recipientes de tampón de un cartucho de reactivos (RC) parcialmente usado con las tiras de sellado para reutilización cuando no se estén utilizando para la purificación. |
| b) | Almacenamiento del cartucho de reactivos (RC) | La conservación del cartucho de reactivos (RC) a una temperatura inferior a 15 °C puede causar la formación de precipitados. |
- Baja cantidad obtenida de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA)**
- | | | |
|----|---|---|
| a) | Las partículas magnéticas no estaban completamente resuspendidas | Antes de comenzar el procedimiento, asegúrese de que las partículas magnéticas estén completamente resuspendidas. Mezcle mediante agitación vorticial durante al menos 3 minutos antes del uso. Una resuspensión incompleta puede causar errores de pipeteo. |
| b) | Atasco de la punta de pipeta debido a material insoluble | No se eliminó de la muestra el material insoluble antes de comenzar el procedimiento de purificación con el instrumento QIAAsymphony SP. |
| c) | El material de la muestra contiene una baja concentración de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) | Debido a las cantidades muy reducidas de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) en las muestras de plasma, la medición de la concentración del ccfDNA puede resultar compleja en función del método de cuantificación utilizado.

Se recomienda utilizar una PCR cuantitativa (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) para comprobar la concentración de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) en los eluidos. |
| d) | Resellado incompleto del cartucho de reactivos (RC) | El contacto con el aire del entorno puede reducir la estabilidad de los tampones y reducir en consecuencia la eficacia de la extracción de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) con un cartucho de reactivos (RC) parcialmente usado. Asegúrese de sellar meticulosamente los recipientes de tampón de un cartucho de reactivos (RC) parcialmente usado con las tiras de sellado para reutilización cuando no se estén utilizando para la purificación. |
- Bajo rendimiento del ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) en aplicaciones posteriores**
- | | | |
|----|---|--|
| a) | El eluido se ha concentrado mediante centrifugación con vacío | No concentre el eluido mediante centrifugación con vacío (p. ej., en una SpeedVac® o un instrumento similar). Esto puede causar una degradación debida a las altas temperaturas y a las sales concentradas en el eluido, que pueden interferir con las aplicaciones posteriores. |
| b) | Arrastre de microesferas | En general, las partículas magnéticas no se transfieren a los eluidos. Si se produce este arrastre, las partículas magnéticas presentes en los eluidos no afectarán a la mayoría de las aplicaciones posteriores. Si se necesitan porciones de eluidos muy grandes para ensayos anterógrados concretos, los eluidos se pueden centrifugar y transferirse a un tubo limpio. |

No hay transferencia de muestras o transferencia de muestras incompleta

Comentarios y sugerencias

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Se carga el volumen de muestra incorrecto para protocolos estándares | Si se carga un volumen de muestra inferior al especificado, hay un mayor riesgo de que la muestra presente una marca ambigua o de que no se transfiera la muestra (marca inválida).
Cargue el volumen de muestra correcto como se describe en la hoja del protocolo y en la lista de materiales de laboratorio correspondientes. |
| b) | Burbujas o espuma en el tubo de muestras | Las burbujas o espuma en la muestra o en el tubo de introducción de muestras puede provocar una detección incorrecta del nivel de líquido y una posterior transferencia incompleta de la muestra. Elimine las burbujas del tubo de muestras. |

Símbolos

En las instrucciones de uso o en el embalaje y en el etiquetado pueden aparecer los siguientes símbolos:



<N>

Contiene suficientes reactivos para <N> pruebas Indica el número total de pruebas IVD que pueden realizarse con el IVD.



Fecha de caducidad



Producto sanitario para diagnóstico in vitro



Marca CE. Este producto cumple los requisitos del reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro



Número de catálogo



Número de lote



Número de material (es decir, etiquetado de los componentes)



Componentes (lista de los elementos incluidos)



Contiene (contenido)

NUM

Número (es decir, viales, frascos)

GTIN

Número mundial de artículo comercial

Rn

“R” es la revisión del Manual de instrucciones de uso y “n” es el número de revisión



Limitación de temperatura



Fabricante



Consultar las instrucciones de uso



Precaución

PROTK

Proteinase K

WELL

Número de recipiente (es decir, recipiente del cartucho de reactivos [RC])

REAG | **CART**

Cartucho de reactivos

Sodium azide

Azida sódica

Apéndice: Cuantificación del ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA)

Debido a las concentraciones muy bajas de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA) en los materiales de muestra, no se recomienda efectuar la medición del ADN con un espectrofotómetro. Para determinar la concentración de ADN libre circulante (circulating cell-free DNA, ccfDNA), se recomienda utilizar un ensayo de cuantificación sensible y preciso basado en fluorescencia o un ensayo de real-time PCR.

Si fuese necesario eliminar las partículas magnéticas, aplique el tubo que contiene el ADN a un separador magnético adecuado (p. ej., QIAGEN 12-Tube Magnet, n.º de catálogo 36912) hasta que se separen las partículas magnéticas.

Si el ADN se encuentra en microplacas, coloque la microplaca en un separador magnético adecuado (p. ej., QIAGEN 96-Well Magnet Type A, n.º de catálogo 36915) hasta que se separen las partículas magnéticas. Si no se dispone de un separador magnético adecuado, centrifugue el tubo que contiene el ADN durante 1 minuto a máxima velocidad en una microcentrifugadora para generar un sedimento con todas las partículas magnéticas que queden en el tubo.

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de cat.
PreAnalytiX		
QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) (192)	Incluye 2 cartuchos de reactivos (RC) y tubos con Proteinase K y accesorios	768566
PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) (100)	100 tubos: 16 x 100 mm, 1,5 ml aditivo, volumen de sangre extraído 10 ml	768165
QIAGEN		
QIASymphony SP instrument	Módulo de preparación de muestras QIASymphony, garantía de 1 año para piezas y mano de obra	9001297
Productos QIAGEN relacionados		
Proteinase K (10 ml)	1 frasco de 10 ml	19133
Reagent Cartridge Holder (2)	Soporte de cartucho de reactivos (RC) para utilizar con el instrumento QIASymphony SP	997008
Cooling Adapter, 2 ml, v2, Qsym	Adaptador de refrigeración para tubos de tapa de rosca de 2 ml. Para utilizar en el cajón "Eluate" (Eluidos) del instrumento QIASymphony SP	9020674
Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym	Adaptador de refrigeración para gradillas EMT. Para utilizar en el cajón "Eluate" (Eluidos) del instrumento QIASymphony SP	9020730

Producto	Contenido	N.º de cat.
Cooling Adapter, Snap-Cap Microtube QIASymphony, Qsym	Adaptador de refrigeración para tubos Eppendorf® LoBind Snap Cap Safe-Lock de 1,5 ml. Para utilizar en el cajón "Eluate" (Eluidos) del instrumento QIASymphony SP	9020731
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Cartuchos de preparación de muestras de 8 pocillos para su uso con el instrumento QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Cubiertas para 8 barras para su uso con el instrumento QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl (1024)	Puntas con filtro desechables, engradilladas (8 × 128). Para uso con QIAcube® y el instrumento QIASymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Puntas con filtro desechables, engradilladas (8 × 128). Para su uso con los instrumentos QIASymphony SP/AS	997024
Tip Disposal Bags (15)	Bolsas para eliminación de puntas para utilizar con el instrumento QIASymphony SP	9013395
12-Tube Magnet	Imán para separar las partículas magnéticas en 12 tubos de 1,5 ml o de 2 ml	36912
96-Well Magnet Type A	Imán para separar las partículas magnéticas en pocillos de placas de 96 pocillos, 2 microplacas FB de 96 pocillos	36915

Producto	Contenido	N.º de cat.
Reuse Seal Set (20)	Juegos de sellado para reutilización para el sellado de cartuchos de reactivos (RC) parcialmente usados del instrumento QIASymphony	997006
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Tubos de polipropileno no estériles (capacidad máxima de 0,85 ml, menos de 0,7 ml de capacidad de almacenamiento, 0,4 ml de capacidad de elución); 2304 en gradillas de 96; incluye tiras para tapones	19588
Caps for Elution Microtubes (50 x 8)	Tapones para microtubos de elución (50 x 8)	19591
14 ml Falcon Tube	Tubo de muestra de poliestireno de fondo redondeado 17 x 100 mm utilizado como soporte para muestras para el instrumento QIASymphony SP	Corning, 352051

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Puede encontrar los manuales de uso y las guías del usuario de los kits de QIAGEN en www.PreAnalytiX.com y www.qiagen.com, o puede solicitarlos al servicio técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Historial de revisiones del documento

Revisión	Descripción
R1, mayo de 2021	Versión inicial

Pedidos www.qiagen.com/shop | Servicio técnico support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com o PreAnalytiX.com