



Junio de 2022

Instrucciones de uso del QIA Symphony[®] DSP DNA Mini Kit (hoja de protocolo)

Protocolos Tissue_LC_200_V7_DSP and Tissue_HC_200_V7_DSP

Versión 2



Para uso diagnóstico in vitro

Para su uso con QIA Symphony DSP DNA Mini Kit (192)



937236



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemania

R1
La hoja de protocolo está disponible electrónicamente y puede encontrarse en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com.

Información general

El QIAasymphony DSP DNA Kit se ha diseñado para diagnóstico in vitro.

Estos protocolos sirven para la purificación del ADN total procedente de tejidos y de tejidos fijados con formalina e incorporados en parafina (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) mediante el instrumento QIAasymphony SP y el QIAasymphony DSP DNA Mini Kit.

En función del tipo de muestra recomendamos usar un protocolo de bajo contenido (LC) o de alto contenido (HC). Los tejidos proporcionarán un rendimiento de ADN mayor si se procesan con el protocolo de alto contenido, pero se puede utilizar el protocolo de bajo contenido en combinación con un volumen de elución reducido (50 µl), si se necesita una concentración elevada de ADN. Para los tejidos FFPE recomendamos utilizar el protocolo de bajo contenido.

Protocolo de bajo contenido

Kit	QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (n.º de catálogo 937236)
Material de muestra	Tejido FFPE y tejido* En una preparación se pueden combinar hasta 4 cortes de tejido FFPE, cada uno con un grosor máximo de 10 µm, u 8 secciones con un grosor máximo de 5 µm y una superficie máxima de 250 mm ² .
Nombre del protocolo	Tissue_LC_200_V7_DSP
Conjunto de controles de ensayo predeterminado	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Volumen de elución	50 µl, 100 µl, 200 µl o 400 µl
Versión del software requerida	Versión 4.0 o superior
Configuración del software requerida para el uso IVD	Perfil predeterminado 1

* Consulte el protocolo de alto contenido para obtener información sobre las muestras de tejidos.

Protocolo de alto contenido

Kit	QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (n.º de catálogo 937236)
Material de muestra	Tejido Si no se dispone de información sobre el rendimiento esperado, recomendamos comenzar con 25 mg de material de muestra. En función del rendimiento obtenido, se puede aumentar el tamaño de la muestra en las preparaciones subsiguientes.
Nombre del protocolo	Tissue_HC_200_V7_DSP
Conjunto de controles de ensayo predeterminado	ACS_TissueHLC_200_V7_DSP
Volumen de elución	50, 100, 200 o 400 µl
Versión del software requerida	Versión 4.0 o superior
Configuración del software requerida para el uso IVD	Perfil predeterminado 1

Material necesarios pero no suministrados

Para todos los tipos de muestras

- Buffer ATL, 4 x 50 ml (n.º de catálogo 939016)
- Para minimizar el contenido de ARN: RNase A sin ADNasa (solución madre de 100 mg/ml)

Para tejidos FFPE (desparafinación sin xileno)

- Deparaffinization Solution (n.º de catálogo 939018)

Para tejidos FFPE (desparafinación con xileno)

- Xileno (99-100 %)
- Etanol (96-100 %)*

Cajón «Sample» (Muestras)

Tipo de muestra	Tejido FFPE y tejido
Volumen de muestra	220 µl (necesarios por muestra, por protocolo)*
Volumen de muestra procesado	200 µl
Tubos de muestra primarios	n/a
Tubos de muestra secundarios	Si desea obtener más información, consulte la lista de materiales de laboratorio que encontrará en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com .
Insertos	Si desea obtener más información, consulte la lista de materiales de laboratorio que encontrará en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com .

* Tanto para protocolos de alto y bajo contenido, el sistema no reconocerá si la muestra de volumen es menor que 220 µl debido a que la transferencia de muestras se realiza sin detección de nivel de líquido. Por ello deberá asegurarse de que el volumen de entrada de la muestra sea 220 µl.

n/a = no aplicable.

Cajón «Reagents and Consumables» (Reactivos y consumibles)

Posición A1 y/o A2	Cartucho de reactivos (RC)
Posición B1	n/a
Soporte de gradillas de puntas 1-17	Puntas con filtro desechables, 200 µl o 1500 µl
Soporte de caja unitaria 1-4	Cajas unitarias que contienen cartuchos de preparación de muestras o 8-Rod Covers

n/a = no aplicable.

* No utilice alcohol desnaturalizado que contenga sustancias adicionales como metanol o metiletilcetona.

Cajón «Waste» (Desechos)

Soporte de caja unitaria 1-4	Cajas unitarias vacías
Soporte de la bolsa de desechos	Bolsa de desechos
Soporte para frasco de desechos líquidos	Frasco de desechos líquidos vacío

Cajón «Eluate» (Eluidos)

Gradilla de elución (recomendamos utilizar la ranura 1, posición de refrigeración)

Si desea obtener más información, consulte la lista de materiales de laboratorio que encontrará en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com.

Materiales de plástico necesarios

Material de plástico	Un lote 24 muestras*	Dos lotes 48 muestras*	Tres lotes 72 muestras*	Cuatro lotes 96 muestras*
Disposable filter-tips, 200 µl [†]	26	50	74	98
Disposable filter-tips, 1500 µl [†]	72	136	200	264
Sample prep cartridges [§]	21	42	63	84
8-Rod Covers [¶]	3	6	9	12

* Si se utilizan menos de 24 muestras por lote, se reduce el número de puntas con filtro desechables necesarias por serie analítica.

[†] Hay 32 puntas con filtro por gradilla de puntas.

[‡] El número de puntas con filtro necesarias incluye las puntas con filtro para 1 examen de inventario por cartucho de reactivos.

[§] Hay 28 cartuchos de preparación de muestras por caja unitaria.

[¶] Hay doce 8-Rod Covers por caja unitaria.

Nota: Los números de puntas con filtro proporcionados pueden diferir de los números mostrados en la pantalla táctil dependiendo de la configuración. Recomendamos cargar el número máximo posible de puntas.

Volumen de elución

El volumen de elución se selecciona en la pantalla táctil. En función del tipo de muestra y del contenido de ADN, el volumen final puede ser en hasta 15 µl inferior al volumen seleccionado. Debido a que el volumen de eluido puede diferir, recomendamos comprobar el volumen de eluido real cuando se utilice un sistema de preparación automatizada del ensayo que no verifique el volumen de eluido antes de la transferencia. La elución en volúmenes más bajos aumentan la concentración final de ADN, pero reducen ligeramente el rendimiento. Recomendamos utilizar un volumen de elución adecuado para la aplicación posterior prevista.

Preparación del material de muestra

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes, que se pueden solicitar al proveedor del producto.

Para conocer las recomendaciones sobre la recogida general, el transporte y el almacenamiento, consulte la directriz MM13-A del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI) «Recogida, transporte, preparación y almacenamiento de muestras para métodos moleculares».

Antes de comenzar

- Compruebe si existe precipitado blanco en el Buffer ATL. En caso necesario, incube durante 30 minutos a 37 °C, agitando ocasionalmente para disolver el precipitado.
- Ajuste una termomezcladora o un bloque térmico con agitador a la temperatura necesaria para el pretratamiento correspondiente.

Tejidos

Para la purificación del ADN se pueden utilizar tejidos frescos y congelados. El rendimiento y la calidad de ADN dependerán del tipo, de la fuente y de las condiciones de almacenamiento del tejido. El tejido fresco se puede cortar en pequeños trozos y almacenar a -20 °C o -80 °C antes del procesamiento. En general recomendamos usar el protocolo de alto contenido que proporcionará valores de ADN mayores. El protocolo de bajo contenido en combinación con el volumen de elución de 50 µl solo se recomienda si se necesitan concentraciones elevadas de ADN para análisis anterógrados. Si no se dispone de información sobre el rendimiento esperado, recomendamos comenzar con 25 mg de material de muestra y utilizar el protocolo de alto contenido y el volumen de elución de 200 µl. En función del rendimiento obtenido, se puede aumentar el tamaño de la muestra o reducir el volumen de elución en las preparaciones subsiguientes. Tenga en cuenta que la sobrecarga de las preparaciones en combinación con volúmenes de elución reducidos puede provocar un arrastre de partículas magnéticas hacia el eluido y comprometer la pureza del ADN y el análisis anterógrado.

Nota: Cuando se trabaje con muestras de tejido congeladas, debe tenerse en cuenta la norma ISO 20184-3:2021 (E) para la extracción de NA automatizada a partir de muestras de tejido congeladas.

Nota: La estabilidad de las muestras depende en gran medida de diversos factores y se relaciona con la aplicación posterior específica. Es responsabilidad del usuario consultar las instrucciones de uso para la aplicación posterior específica utilizada en su laboratorio y/o validar el flujo de trabajo completo para establecer las condiciones de almacenamiento apropiadas.

Protocolo de pretratamiento para tejidos

1. Transfiera la muestra de tejido a un tubo de microcentrifugadora de 2 ml (no suministrado).
2. Añada 220 µl de Buffer ATL.
3. Añada 20 µl de proteinasa K y mezcle golpeando ligeramente el tubo.
Nota: Use proteinasa K de la gradilla de enzimas del QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
4. Coloque el tubo en una termoagitadora o en un bloque térmico con agitador e incúbelo a 56 °C, agitándolo a 900 rpm hasta que el tejido se haya lisado completamente.
Nota: El tiempo de lisis depende del tipo de tejido procesado. En la mayoría de tejidos, la lisis se completa en 3 horas. Si no se completa después de 3 horas, tal como indica la presencia de material insoluble o lisados muy viscosos, puede prolongar el tiempo de lisis o eliminar el material insoluble por centrifugado como se describe en el paso 6. Es posible realizar la lisis durante la noche y no afecta a la preparación.
5. Para minimizar el contenido de ARN en la muestra, añada 4 µl de RNase A (100 mg/ml) y deje incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de continuar con el paso 6.
6. Homogeneice la muestra pipeteando arriba y abajo varias veces.
Nota: Si todavía detecta trozos de material insoluble, centrifugue a 3000 x g durante 1 minuto.

7. Transfiera con cuidado 220 µl del sobrenadante a tubos de muestra compatibles con el soporte para muestras del instrumento QIAasymphony SP.
8. Para una lista completa de tubos de muestra compatibles, consulte la lista de material de laboratorio en www.qiagen.com. Recomendamos utilizar tubos de 2 ml (p. ej., Sarstedt, n.º de catálogo 72.693 o 72.608). 0.

Tejido FFPE

Los procedimientos FFPE convencionales provocan siempre una fragmentación significativa de los ácidos nucleicos. Para limitar el grado de fragmentación del ADN, asegúrese de:

- Fijar las muestras de tejido con formalina del 4 al 10 % tan rápido como sea posible tras la extracción quirúrgica.
- Aplicar un tiempo de fijación de 14 a 24 horas (los tiempos de fijación superiores producen una fragmentación más intensa del ADN, lo que provoca un rendimiento deficiente en los ensayos anterógrados)
- Deshidratar las muestras meticulosamente antes de incorporarlas (los restos de formalina pueden inhibir la digestión por la proteinasa K)

El material de partida para la purificación del ADN debe estar compuesto por cortes recientes de tejido FFPE. En una preparación se pueden procesar hasta 4 cortes, cada uno con un grosor máximo de 10 µm, u 8 secciones con un grosor máximo de 5 µm y una superficie máxima de 250 mm². Si no dispone de información acerca de la naturaleza de su material de partida, le recomendamos que comience con no más de 3 cortes en una única preparación. En función del rendimiento y de la pureza del ADN es posible utilizar un máximo de 8 cortes en las preparaciones subsiguientes.

Nota: Cuando se trabaje con tejido FFPE, debe tenerse en cuenta la norma ISO 20166-3:2018 (E) para la extracción de NA automatizada a partir de muestras de tejido FFPE para obtener información adicional sobre la manipulación de muestras.

Nota: Los protocolos para tejidos FFPE solo están específicamente diseñados para purificar conjuntamente cantidades reducidas de ARN. Esto producirá un valor reducido de medición fotométrico en comparación con los valores obtenidos con el QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit manual.

Protocolo de pretratamiento para tejidos FFPE

Método 1: desparafinación mediante Deparaffinization Solution

1. Recorte con un bisturí la parafina sobrante del bloque de muestra.
2. Seccione un máximo de 4 cortes con un grosor de 10 µm o un máximo de 8 cortes con un grosor de 5 µm.
Nota: Si la superficie de la muestra ha estado expuesta al aire, elimine las primeras 2-3 secciones.
3. Introduzca los cortes inmediatamente en un tubo Sarstedt de 2 ml (no suministrado, n.º de catálogo 72.693 o 72.608) que sea compatible con el soporte para muestras del instrumento QIAasymphony SP.
4. Añada 200 µl de Buffer ATL a las secciones.
5. Añada 20 µl de proteinasa K.

Nota: Use proteinasa K de la gradilla de enzimas del QIAasymphony DSP DNA Mini Kit.

6. Añada 160 µl o 320 µl de Deparaffinization Solution (consulte la tabla siguiente) y mezcle vorticialmente.

Grosor de los cortes	Número de cortes	Volumen de Deparaffinization Solution
5 µm	1-4	160 µl
	5-8	320 µl
10 µm	1-2	160 µl
	3-4	320 µl

7. Coloque el tubo en una ThermoMixer o en un bloque térmico con agitador e incúbelo a 56 °C durante 1 hora, agitándolo a 1000 rpm hasta que el tejido se haya lisado completamente.

Nota: El tiempo de lisis depende del tipo de tejido procesado. En la mayoría de tejidos, la lisis se completa en 1 hora. Si no se completa después de 1 hora, tal como lo indica la presencia de material insoluble, puede prolongar el tiempo de lisis o sedimentar el material insoluble por centrifugado como se describe en el paso 10. Es posible realizar la lisis durante la noche y no afecta a la preparación.

8. Incube a 90 °C durante 1 hora.

Nota: La incubación a 90 °C en Buffer ATL invierte parcialmente la alteración de los ácidos nucleicos por el formaldehído. Los tiempos de incubación más largos o las temperaturas de incubación mayores pueden provocar una fragmentación más intensa del ADN. Si emplea un único bloque calefactor, deje la muestra a temperatura ambiente tras la incubación a 56 °C hasta que el bloque calefactor haya alcanzado los 90 °C.

9. Para minimizar el contenido de ARN en la muestra, añada 2 µl de RNase A (100 mg/ml) a la fase inferior y deje incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de continuar con el paso 10. Permita que la muestra se enfríe a temperatura ambiente antes de añadir la RNase A.

10. Centrifugue a velocidad máxima durante 1 minuto a temperatura ambiente.

11. Transfiera los tubos (que contienen las dos fases) con cuidado al soporte para muestras del instrumento QIASymphony SP.

Método 2: desparafinación utilizando xileno

1. Recorte con un bisturí la parafina sobrante del bloque de muestra.

2. Seccione un máximo de 4 cortes con un grosor de 10 µm o un máximo de 8 cortes con un grosor de 5 µm.

Nota: Si la superficie de la muestra ha estado expuesta al aire, elimine las primeras 2-3 secciones.

3. Introduzca los cortes inmediatamente en un tubo de microcentrifugadora de 1,5 o 2 ml (no suministrado) y añada 1 ml de xileno a la muestra. Cierre la tapa y mezcle vigorosamente mediante agitación vorticial durante 10 segundos.

4. Centrifugue a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente.

5. Elimine el sobrenadante mediante pipeteado. No elimine ninguna parte del sedimento.

6. Añada 1 ml de etanol (96-100 %) al sedimento y mezcle mediante agitación vorticial.

Nota: El etanol extrae el xileno residual de la muestra.

7. Centrifugue a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente.

8. Elimine el sobrenadante mediante pipeteado. No elimine ninguna parte del sedimento.

Nota: Elimine con cuidado cualquier resto de etanol con una punta de pipeta fina.

9. Abra el tubo e incúbelo a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 10 minutos o hasta que se haya evaporado todo el etanol residual.

Nota: La incubación se puede realizar a una temperatura máxima de 37 °C.

10. Resuspenda el sedimento en 220 µl de Buffer ATL.

11. Añada 20 µl de proteinasa K y mezcle mediante agitación vorticial.

Nota: Use proteinasa K de la gradilla de enzimas del QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

12. Incube a 56 °C durante 1 hora (o hasta que la muestra se haya lisado completamente).

Nota: El tiempo de lisis depende del tipo de tejido procesado. En la mayoría de tejidos, la lisis se completa en una hora. Si no se completa después de 1 hora, tal como lo indica la presencia de material insoluble, puede prolongar el tiempo de lisis o eliminar el material insoluble por centrifugado como se describe en el paso 16. Es posible realizar la lisis durante la noche y no afecta a la preparación.

13. Incube a 90 °C durante 1 hora.

Nota: La incubación a 90 °C en Buffer ATL invierte parcialmente la alteración de los ácidos nucleicos por el formaldehído. Los tiempos de incubación más largos o las temperaturas de incubación mayores pueden provocar una fragmentación más intensa del ADN. Si emplea un único bloque calefactor, deje la muestra a temperatura ambiente tras la incubación a 56 °C hasta que el bloque calefactor haya alcanzado los 90 °C.

14. Centrifugue brevemente la muestra para eliminar las gotas del interior del tapón.

15. Para minimizar el contenido de ARN en la muestra, añada 2 µl de RNase A (100 mg/ml) y deje incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de continuar con el paso 16. Permita que la muestra se enfríe a temperatura ambiente antes de añadir la RNase A.

16. Transfiera con cuidado 220 µl del lisado a tubos de muestra compatibles con el soporte para muestras del instrumento QIASymphony SP.

Nota: Si el lisado contiene material no digerido, centrifugue a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de transferir el sobrenadante a los tubos de muestra. Para una lista completa de tubos de muestra compatibles, consulte la lista de material de laboratorio en www.qiagen.com. Recomendamos utilizar tubos de 2 ml (p. ej., Sarstedt, n.º de catálogo 72.693 o 72.608).

Conservación de los eluidos

Se recomienda retirar la placa de eluidos del cajón «Eluate» (Eluidos) nada más finalizar la serie. Las placas de elución se pueden dejar en el instrumento QIASymphony SP una vez haya finalizado la serie durante la noche (como máximo 12 horas, incluido el tiempo de la serie; condiciones ambientales recomendadas: 18-26 °C y 20-75 % de humedad relativa). Dependiendo de la temperatura y de la humedad, el eluido puede experimentar condensación o evaporación.

Para un almacenamiento a corto plazo, los eluidos deben almacenarse a temperatura ambiente un máximo de 2 semanas. Para un almacenamiento a largo plazo, le recomendamos almacenarlo entre 2 y 8 °C, a -20 °C o -80 °C.

Nota: La estabilidad del eluido depende en gran medida de diversos factores y se relaciona con la aplicación posterior específica. Se ha establecido para el QIASymphony DSP DNA Mini Kit en conjunto con aplicaciones posteriores ejemplares. Es responsabilidad del usuario consultar las instrucciones de uso para la aplicación posterior específica utilizada en su laboratorio y/o validar el flujo de trabajo completo para establecer las condiciones de almacenamiento apropiadas.

Cuestión importante antes de comenzar

- Las partículas magnéticas de QIASymphony purifican conjuntamente el ARN y el ADN si ambos están presentes en la muestra. Si necesita ADN sin ARN, añada RNase A a la muestra en el paso indicado en el protocolo de pretratamiento correspondiente.

Limitaciones y sustancias interferentes

Tenga en cuenta que durante el desarrollo del QIASymphony DSP DNA Mini Kit no se han identificado sustancias interferentes que tengan un impacto negativo en la preparación de muestra.

Nota: Se realizó la prueba utilizando aplicaciones posteriores ejemplares para una evaluación de la calidad de los ácidos nucleicos extraídos. Sin embargo, las diferentes aplicaciones posteriores podrían tener diferentes necesidades con respecto a la pureza (p. ej., ausencia de posibles sustancias interferentes), por lo que es necesario establecer la identificación y las pruebas de sustancias relevantes como parte del desarrollo de aplicaciones posteriores para cualquier flujo de trabajo que involucre los QIASymphony DSP DNA Mini Kits.

Símbolos

Los siguientes símbolos aparecen en este documento. Para obtener una lista completa de los símbolos utilizados en las instrucciones de uso o en el embalaje y etiquetado, consulte el manual de uso.

Símbolo	Definición del símbolo
	Este producto cumple los requisitos del reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro.
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
Rn	«R» es la revisión de las Instrucciones de uso y «n» es el número de revisión
	Fabricante

Historial de revisiones

Revisión	Descripción
R1, junio de 2022	Versión 2, Revisión 1 <ul style="list-style-type: none">Actualización a la versión 2 para cumplir con el IVDSe ha añadido la sección Limitaciones y sustancias interferentesSe ha añadido la sección Conservación de los eluidosSe ha añadido la sección SímbolosSe ha actualizado la sección Preparación del material de muestra

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o la guía del usuario del kit de QIAGEN® correspondiente. Los manuales de uso y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); BD™ (Becton Dickinson and Company); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.
06/2022 HB-3029-S07-001 © 2022, QIAGEN. Reservados todos los derechos.