

Instrucciones de uso del QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit (manual de uso)



50

Versión 2

IVD

Para uso diagnóstico in vitro

Para uso con el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



Número de catálogo

REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R2 **MAT**

1130780ES

Contenido

Uso previsto	4
Usuario previsto	4
Descripción y principio.....	5
Resumen y explicación	5
Principio del procedimiento	5
Materiales suministrados	7
Contenido del kit.....	7
Componentes del kit	8
Materiales necesarios pero no suministrados	9
Reactivos adicionales.....	9
Consumibles	9
Equipo	9
Advertencias y precauciones.....	10
Información de seguridad.....	10
Información para emergencias.....	11
Precauciones	11
Eliminación.....	12
Almacenamiento y manipulación de reactivos	13
Estabilidad en uso	13
Manipulación y almacenamiento de material de muestra	14
Procedimiento	15
Protocolo: aislamiento de ADN genómico a partir de cortes de tejido FFPE	21

Control de calidad.....	25
Limitaciones	26
Características del rendimiento	27
Guía de resolución de problemas.....	28
Símbolos	30
Apéndice: Manipulación	33
Información para pedidos	34
Historial de revisiones del documento	35

Uso previsto

El QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit es un sistema que utiliza la tecnología de membrana de gel de sílice (tecnología QIAamp) para el aislamiento y la purificación de ADN genómico procedente de muestras biológicas fijadas en formalina e incorporadas en parafina (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

Tiene como fin la preparación manual de las muestras y no proporciona resultados de ensayo cualitativos ni cuantitativos.

Usuario previsto

Este producto está destinado a ser utilizado por usuarios profesionales, como técnicos y médicos que hayan recibido formación en técnicas de biología molecular para diagnóstico in vitro (IVD).

Descripción y principio

Resumen y explicación

El QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit se utiliza para la purificación de ADN procedente de secciones tisulares FFPE. Utiliza la bien consolidada microtecnología QIAamp DNA para la purificación de ADN genómico y mitocondrial procedente de pequeños volúmenes o tamaños de muestras. El kit combina las propiedades de unión selectiva de una membrana de gel de sílice con volúmenes de elución flexibles.

Las condiciones de lisis permiten una purificación eficiente del ADN genómico procedente de secciones tisulares FFPE sin necesidad de incubación durante toda la noche. La incubación a una temperatura elevada una vez que la digestión en proteínasa K elimina parcialmente la reticulación de la formalina en el ADN liberado, lo que puede mejorar potencialmente los resultados, así como el rendimiento del ADN en los ensayos anterógrados. Debe tenerse en cuenta que el ADN aislado de las muestras FFPE normalmente presenta un peso molecular inferior al del ADN procedente de muestras frescas o congeladas. El grado de fragmentación depende del tipo y de la antigüedad de la mezcla, así como de las condiciones empleadas para la fijación.

Tras la lisis de la muestra, el procedimiento del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit permite el procesamiento simultáneo de varias muestras.

Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema con cualquier procedimiento utilizado en su laboratorio que no esté contemplado en los estudios de rendimiento de QIAGEN® descritos en el manual de uso.

Principio del procedimiento

El procedimiento QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit consta de seis pasos (Figura 1):

- Eliminación de la parafina: la parafina se disuelve en xileno y se elimina.
- Lisis: la muestra es lisada a 56 °C en condiciones desnaturizantes con proteínasa K.

- Calor: la incubación a 90 °C revierte la reticulación de la formalina.
- Unión: el ADN se une a la membrana y el contaminante fluye a través de esta.
- Lavado: los contaminantes residuales desaparecen al lavarlos.
- Elución: el ADN puro y concentrado se eluye desde la membrana.

Procedimiento de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue




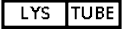

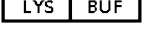
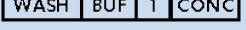
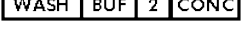





Ilustración 1. Procedimiento del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Materiales suministrados

Contenido del kit

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit	(50)
N.º de catálogo	60404
Número de preparaciones	50

	Denominación	Símbolos	Cantidad
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Columnas QIAamp MinElute con tubos de lavado)		50
WT	Wash Tubes (Tubos de lavado [2 ml])		3 × 50
ET	Elution Tubes (Tubos de elución [1,5 ml])		50
LT	Lysis Tubes (Tubos de lisis [2 ml])		50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Tampón de lisis Tissue)		10 ml
AL	Lysis Buffer* (Tampón de lisis)		12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Tampón de lavado 1) (concentrado)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Tampón de lavado 2) (concentrado)		13 ml
ATE	Elution Buffer† (tampón de elución)		12 ml
PK	Proteinase K (Proteinasa K)		1,25 ml
–	Instrucciones de uso (manual de uso)		1

* Contiene una sal de guanidina. No es compatible con desinfectantes que contengan lejía. Consulte la página 10 para conocer las Advertencias y precauciones.

† Contiene azida sódica como conservante.

Componentes del kit

Los componentes principales del kit se explican a continuación.

Tabla 1. Principios activos en los reactivos suministrados

Reactivo		Principios activos	Concentración (p/p) [%]
Símbolo	Nombre		
ATL	Buffer ATL	Dodecilsulfato sódico	De ≥ 1 a < 10
AL	Buffer AL	Clorhidrato de guanidina Ácido maleico	De > 30 a < 50 De $\geq 0,1$ a < 1
AW1	Buffer AW1	Clorhidrato de guanidina Etanol	De ≥ 50 a < 70 De ≥ 10 a < 90
AW2	Buffer AW2	Etanol	De ≥ 10 a < 90
ATE	Buffer ATE	Ninguno	-
PK	Proteinase K (Proteinasa K)	Proteinasa K	De ≥ 1 a < 10

Para reducir al mínimo el riesgo de que se produzca cualquier efecto negativo sobre los resultados diagnósticos generados tras el aislamiento de ADN, deben utilizarse controles apropiados para las aplicaciones posteriores.

Materiales necesarios pero no suministrados

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 puede solicitar al proveedor del producto.

Reactivos adicionales

- Xileno
- Etanol (96-100 %) *

Consumibles

- Si se decide no utilizar los tubos proporcionados en el kit, recomendamos tubos de microcentrifugadora de 1,5 o 2 ml (para los pasos de lisis) y de 1,5 ml (para los pasos de elución) (p. ej., los que ofrece Sarstedt®, n.º de cat. 72.690). Recomendamos los tubos de forma cónica, libres de ADNasa/ARNasa, con tapas seguras. Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema con los procedimientos utilizados en cada laboratorio que no estén contemplados en los estudios de rendimiento de QIAGEN.
- Pipetas y puntas de pipeta (para evitar la contaminación cruzada, recomendamos encarecidamente puntas de pipeta resistentes a aerosoles).

Equipo[†]

- Termomezclador[‡], incubador orbital térmico, bloque calefactor o baño de agua que permita la incubación a 56 °C, 70 °C y 90 °C
- Microcentrifugadora[†] con rotor para tubos de 2 ml
- Agitador vorticial

* No utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona.

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

[‡] Para garantizar el correcto procesamiento de las muestras en los procedimientos QIAamp DSP DNA FFPE, es muy recomendable calibrar los instrumentos siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Advertencias y precauciones

Basándose en la gestión de riesgos de QIAGEN, se implementaron todas las medidas de control de riesgo previstas en el diseño del producto. El riesgo residual general se considera aceptable y el uso del dispositivo se considera seguro. Este manual de uso contiene instrucciones, advertencias y precauciones para garantizar la seguridad y el rendimiento del dispositivo. que deben seguirse estrictamente.

Tenga en cuenta que puede ser necesario que tenga que consultar las normativas locales para conocer los requisitos de notificación, en relación con los sucesos graves que hayan ocurrido en relación con el dispositivo; al fabricante y/o su representante autorizado y a la autoridad sanitaria del país en el que resida el usuario y/o el paciente.

Información de seguridad

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. Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN.

PRECAUCIÓN NO añada lejía ni soluciones ácidas directamente a los residuos de la preparación de las muestras.



- El Buffer AL y el Buffer AW1 contienen clorhidrato de guanidina, susceptible de formar compuestos altamente reactivos cuando se combina con lejía.
- Si se derrama el líquido que contiene estos tampones, límpielo con detergente específico de laboratorio y agua. Si el líquido derramado contiene agentes potencialmente infecciosos, limpie el área afectada con detergente de laboratorio y agua en primer lugar y, a continuación, con solución de hipoclorito sódico al 1 % (v/v).

- Los materiales de muestra y las muestras son potencialmente infecciosos. Deseche los residuos de muestras y ensayos conforme a los procedimientos de seguridad local.

Información para emergencias

CHEMTREC

EEE. UU. y Canadá 1 -800-424-9300

Fuera de EE. UU. y Canadá +1 703-527-3887

Precauciones

Buffer AL



Contiene: clorhidrato de guanidina y ácido maleico. ¡Advertencia! Puede ser nocivo en caso de ingestión o inhalación. Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Si la irritación ocular persiste: consultar a un médico. 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. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: lavar con agua y jabón abundantes. En caso de irritación cutánea: consultar a un médico. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara.

Buffer ATL



¡Advertencia! Causa irritación leve de la piel. En caso de irritación cutánea: consultar a un médico.

Buffer AW1



Contiene: clorhidrato de guanidina. ¡Advertencia! Nocivo en caso de ingestión o inhalación. Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico en caso de malestar. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara.

Proteinase K



Contenido: 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. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado. Si se presentan síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico. EN CASO DE INHALACIÓN: en caso de dificultad para respirar, aleje a la víctima de la zona contaminada y manténgala en reposo en una posición cómoda para respirar. Llevar equipo de protección respiratoria.

Eliminación

Los residuos contienen muestras y reactivos. Estos residuos pueden contener material tóxico o infeccioso y deben eliminarse adecuadamente. Consulte en la normativa local en materia de seguridad los procedimientos de eliminación adecuados.

Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Dichas fichas están disponibles en línea en un formato PDF en www.qiagen.com/safety, donde podrá encontrar, ver e imprimir la ficha de datos de seguridad de cada kit de QIAGEN y los componentes del kit.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

Las columnas QIAamp MinElute deben almacenarse a entre 2-8 °C tras su recepción y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

Todas las soluciones tampón se pueden conservar a temperatura ambiente (15-25 °C) y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el kit, si no se abre.

Estabilidad en uso

El Buffer AW1 y Buffer AW2 reconstituidos pueden almacenarse a temperatura ambiente (15-25 °C) durante un año como máximo o hasta la fecha de caducidad correspondiente al kit, lo que suceda antes.

Manipulación y almacenamiento de material de muestra

El QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit se ha desarrollado para su uso con muestras FFPE.

La estabilidad del ADN depende de diversos factores, como la recogida, la manipulación, la preparación de muestras y las condiciones de almacenamiento que pueden repercutir en su uso en la aplicación posterior. Es importante consultar las instrucciones de uso de la aplicación posterior específica y/o verificar y validar el flujo de trabajo completo para establecer las condiciones apropiadas.

Para obtener información general sobre los procedimientos de laboratorio de recogida, manipulación, preparación y las condiciones de almacenamiento de muestras FFPE, consulte la norma ISO 20166-3:2018 «Examen de diagnóstico molecular in vitro. Especificaciones para los procesos preanalíticos para tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFPE). Parte 3: ADN aislado» y CLSI MM13-A «Recogida, transporte, preparación y almacenamiento de muestras para métodos moleculares -Guía aprobada».

El ADN se eluye en Buffer ATE y está inmediatamente listo para su uso en reacciones de amplificación o para su almacenamiento (las condiciones dependerán de los requisitos del usuario). Consulte los manuales de uso del kit correspondientes para conocer las condiciones de almacenamiento recomendadas para aplicaciones posteriores de QIAGEN específicas.

Procedimiento

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Todos los reactivos suministrados con el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit se suministran para uso exclusivo con otros reactivos del mismo QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Para mantener un rendimiento óptimo de los reactivos del kit, no los sustituya.
- Tras recibir el kit, compruebe que los componentes no hayan sufrido ningún daño. Si los envases o los frascos de solución tampón están dañados, póngase en contacto con el Servicio Técnico de QIAGEN o con su distribuidor local. Si se derrama algún líquido, consulte la “Advertencias y precauciones” (página 10). No utilice los componentes dañados de un kit, ya que su rendimiento podría verse afectado.
- No utilice componentes de kits distintos del que está utilizando, a menos que tengan el mismo número de lote.
- Procure evitar la contaminación microbiana de los reactivos del kit.
- Este kit solo debe utilizarlo personal cualificado para los métodos de laboratorio de diagnóstico in vitro.
- Al manipular los reactivos y las muestras, utilice siempre guantes de látex o de vinilo para evitar la contaminación procedente de la superficie de la piel o de un equipo de laboratorio con polvo. Las manos y el polvo pueden ser portadores de bacterias y hongos, y son fuentes comunes de contaminación. Cámbiese los guantes con frecuencia y mantenga los tubos cerrados.
- Las soluciones tampón sin usar, los líquidos y los restos de muestras deberán desecharse siguiendo los procedimientos locales.
- Si utiliza su propio material plástico, se recomienda el uso de tubos cónicos desechables de polipropileno de baja unión libres de ADNasa/ARNasa, de 1,5-2 ml y con tapas de seguridad durante todo el procedimiento de purificación.
- Realice todos los pasos de la centrifugación a temperatura ambiente (15-25 °C).
- Todas las soluciones tampón se deben conservar a temperatura ambiente (15-25 °C) y mezclar bien antes de su uso.

- Ajuste un termomezclador o un incubador orbital térmico a 56 °C para su uso en el paso 9. Si no dispone de un ThermoMixer o un incubador orbital térmico, puede utilizar en su lugar un bloque térmico calefactor o un baño de agua.
- Si Buffer AL o Buffer ATL contienen precipitados, disuélvalos mediante calentamiento a 70 °C y agitando con suavidad.
- Asegúrese de que Buffer AW1 y Buffer AW2 se hayan preparado siguiendo las instrucciones que se indican a continuación.
- Los procedimientos de control de calidad de QIAGEN utilizan pruebas funcionales de liberación de kit para cada lote de kit individual. Por lo tanto, no mezcle reactivos de lotes distintos de kit y no combine reactivos individuales de diferentes lotes de reactivos.

Preparación de soluciones tampón

Preparación de Buffer ATL

- Antes de comenzar el procedimiento, compruebe si se ha formado precipitado en Buffer ATL. En caso necesario, disuélvalo calentando a 70 °C y agitando suavemente.

Preparación de Buffer AL

- Antes de comenzar el procedimiento, compruebe si se ha formado precipitado en Buffer AL. En caso necesario, disuélvalo calentando a 70 °C y agitando suavemente.

Preparación de Buffer AW1

- Añada 25 ml de etanol (96-100 %)* al frasco que contiene 19 ml de Buffer AW1 concentrado. Marque la casilla de verificación de la etiqueta del frasco para indicar que se ha añadido etanol. El Buffer AW1 reconstituido puede almacenarse a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 1 año como máximo o hasta la fecha de caducidad correspondiente al kit, lo que suceda antes. Recomendamos anotar la fecha de reconstitución en la etiqueta del tampón.

Nota: antes de comenzar el procedimiento, mezcle el Buffer AW1 reconstituido mediante agitación.

Preparación de Buffer AW2

- Añada 30 ml de etanol (96-100 %)* al frasco que contiene 13 ml de Buffer AW2 concentrado. Marque la casilla de verificación de la etiqueta del frasco para indicar que se ha añadido etanol. El Buffer AW2 reconstituido puede almacenarse a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 1 año como máximo o hasta la fecha de caducidad correspondiente al kit, lo que suceda antes. Recomendamos anotar la fecha de reconstitución en la etiqueta del tampón.

Nota: antes de comenzar el procedimiento, mezcle el Buffer AW2 reconstituido mediante agitación.

Material inicial

El material de partida para la purificación de ADN son secciones cortadas de tejido FFPE (idealmente, recién cortadas). Se pueden combinar varios cortes en una misma preparación. 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 cada preparación.

* No utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona.

El usuario deberá optimizar el número de cortes, su grosor y área superficial para los procedimientos empleados en su laboratorio. Si se utiliza el kit junto con una aplicación QIAGEN posterior, consulte el correspondiente manual de uso para obtener instrucciones.

Procedimiento de manipulación para evitar la contaminación cruzada

Dada la sensibilidad de las tecnologías de amplificación de los ácidos nucleicos, cuando se manipulen las QIAamp MinElute Columns deben adoptarse las siguientes medidas de precaución con el fin de evitar una posible contaminación cruzada entre las muestras:

- No llene en exceso los tubos con el tejido.
- Cambie de bisturí entre una muestra y otra cuando raspe el tejido.
- Aplique la muestra o la solución con cuidado a la columna QIAamp MinElute. Pipetee la muestra para transferirla a la columna QIAamp MinElute procurando no humedecer el borde de la columna.
- Cambie siempre las puntas de pipeta entre transferencias de líquidos. Recomendamos el uso de puntas de pipeta con filtro para aerosoles.
- Utilice siempre tubos de lavado nuevos al realizar los pasos de lavado de las muestras.
- Asegúrese de que las tapas de los tubos están totalmente cerradas antes de la agitación vorticial y el centrifugado.
- Asegúrese de que la columna QIAamp MinElute está cerrada por completo antes de comenzar el centrifugado.
- Tras haber realizado todos los pasos de agitación vorticial de pulsos y los pasos de incubación a 90 °C, centrifugue brevemente los tubos de microcentrifugadora con el fin de eliminar las gotas del interior de las tapas.
- Abra solo una columna QIAamp MinElute cada vez y evite generar aerosoles.
- Cambie de bisturí siempre entre una muestra y otra.
- Cambie siempre las puntas de pipeta entre transferencias de líquidos. Para minimizar la contaminación cruzada, recomendamos utilizar puntas de pipeta con filtro para aerosoles y evitar el uso de pipetas de varios pasos.
- Use siempre guantes desechables y compruebe regularmente que no se hayan contaminado con el material de las muestras. Deseche los guantes si sospecha que se han contaminado.
- No abra más de un tubo a la vez.

Centrifugación

Las columnas QIAamp MinElute se pueden utilizar en la mayoría de tubos de microcentrifugadora de 1,5-2 ml convencionales. El centrifugado de las columnas QIAamp MinElute se debe realizar a aproximadamente 6000 x g para reducir el ruido de centrifugado. El centrifugado a máxima velocidad no mejora el rendimiento del ADN. Sin embargo, se requiere el centrifugado de las columnas QIAamp MinElute a máxima velocidad en dos pasos del procedimiento: el paso de centrifugado en seco una vez lavadas las membranas y el paso de elución. También se precisa el centrifugado a máxima velocidad para reducir la muestra después del tratamiento con xileno y del paso de lavado con etanol.

Todos los pasos de centrifugado deben realizarse a temperatura ambiente (15-25 °C). Una temperatura de centrifugado baja puede llevar a que la extracción no sea óptima.

Procesamiento de las columnas QIAamp MinElute en una microcentrifugadora

- Cierre siempre las columnas QIAamp MinElute antes de introducirlas en la microcentrifugadora.
- Evite tocar la membrana de la columna QIAamp MinElute con la punta de pipeta.
- Las fracciones líquidas pueden contener residuos peligrosos; elimínelas de la forma apropiada.
- Para llevar a cabo un procesamiento paralelo eficaz de varias muestras, recomendamos llenar una gradilla con tubos de lavado a los que se pueden transferir las columnas QIAamp MinElute después del centrifugado. Los tubos de lavado utilizados que contienen el líquido se pueden eliminar y los nuevos tubos de lavado que contienen las columnas QIAamp MinElute se pueden introducir directamente en la microcentrifugadora.
- Asegúrese de que se mantiene una trazabilidad total de las muestras durante todo el proceso.

Elución de ADN purificado

Para aplicaciones posteriores que precisen volúmenes de partida reducidos (p. ej., algunos ensayos PCR), se podría aumentar la sensibilidad del ensayo mediante un eluido más concentrado pero este también podría aumentar la concentración de potenciales inhibidores.

Si se aumenta el volumen de elución, la concentración de ADN en el eluido disminuirá.

El volumen del eluido recuperado será aproximadamente 5 μ l menor que el volumen del Buffer ATE aplicado a la columna QIAamp MinElute. Por ejemplo, un volumen de elución de 20 μ l produce ≥ 15 μ l de eluido. El volumen del eluido recuperado depende de la naturaleza de la muestra.

Es responsabilidad del usuario optimizar el volumen de elución para cualquier procedimiento utilizado en su laboratorio. Consulte los manuales de uso del kit para conocer los volúmenes de elución recomendados para aplicaciones posteriores de QIAGEN específicas.

Los valores podrían aumentar si la columna se incubaba junto con el Buffer ATE a temperatura ambiente durante, por ejemplo, 5 minutos antes de la centrifugación. El ADN eluido se puede recoger en tubos de elución de 1,5 ml (suministrados). Las condiciones de almacenamiento para el ADN eluido dependen de los requisitos definidos por el usuario. Consulte los manuales de uso del kit para conocer las condiciones de almacenamiento recomendadas para aplicaciones posteriores de QIAGEN específicas.

Protocolo: aislamiento de ADN genómico a partir de cortes de tejido FFPE

Procedimiento

1. Recorte con un bisturí la parafina sobrante del bloque de muestra.
2. Corte las secciones siguiendo las prácticas convencionales del laboratorio (consulte "Material inicial", página 17). El usuario deberá optimizar el número de cortes, su grosor y área superficial para los procedimientos empleados en su laboratorio. Asegúrese de que se mantiene la trazabilidad de las muestras durante todo el procedimiento.
3. Raspe de inmediato el tejido de los cortes con un bisturí estéril en un tubo de lisis (proporcionado). Asegúrese de que todo el tejido disponible se coloca en el tubo. Añada 1 ml de xileno a la muestra, cierre la tapa y agite enérgicamente en un agitador vorticial hasta que se disuelva la parafina (p. ej., 10 s). Asegúrese de que el tubo está totalmente cerrado para evitar que se vierte el xileno, la contaminación cruzada entre muestras y el posible contacto con el xileno.

Nota: utilice el xileno en campana de humos o en otros aparatos de contención adecuados.

4. Centrifugue a máxima velocidad durante aproximadamente 2 minutos a temperatura ambiente para recoger el sedimento del tejido. Ni no se forma sedimento del tejido, repita este paso.

Nota: una temperatura de centrifugado baja puede llevar a que la extracción no sea óptima.

5. Retire y deseche el sobrenadante mediante pipeteo. Conserve el sedimento.

El sobrenadante contiene xileno, que es un residuo peligroso y debe desecharse correctamente conforme a las normativas locales.

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

El etanol extrae el xileno residual de la muestra y debe desecharse debidamente.

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

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

Elimine con cuidado cualquier resto de etanol con una punta de pipeta fina. Abra el tubo e incúbelo a 15-40 °C hasta que se haya evaporado todo el etanol residual. La eliminación del etanol residual es clave para el éxito de la extracción.

Nota: una temperatura de incubación más baja reduce la velocidad de evaporación, mientras que una temperatura más alta puede secar en exceso el sedimento, dificultando su suspensión.

8. Resuspenda el sedimento en 180 µl de Buffer ATL. Añada 20 µl de proteinasa K y mezcle mediante agitación vorticial.

Nota: el sedimento debe estar bien resuspendido en el tampón ATL para garantizar el máximo rendimiento en la recuperación.

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

10. Incube a 90 °C durante 1 hora.

La incubación a 90 °C en Buffer ATL invierte parcialmente la alteración de los ácidos nucleicos por el formaldehído. Unos tiempos de incubación más cortos o unas temperaturas más bajas pueden afectar a la calidad y cantidad de 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.

11. Centrifugue brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
12. Añada a la muestra 200 µl de Buffer AL y mezcle a fondo mediante agitación vorticial. A continuación, añada 200 µl de etanol (96-100 %) y mezcle de nuevo a fondo mediante agitación vorticial.

Es esencial que la muestra, el Buffer AL y el etanol se mezclen inmediatamente y a fondo mediante agitación vorticial o pipeteando hasta conseguir una solución homogénea. El Buffer AL y el etanol pueden mezclarse previamente y añadirse juntos en un solo paso para ahorrar tiempo cuando se procesan varias muestras. Es posible que se forme un precipitado blanco al añadir el Buffer AL y el etanol. Este precipitado no interfiere con el procedimiento QIAamp. Utilice en todo momento una mezcla fresca y deséchela inmediatamente después de su uso.

13. Centrifugue brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
14. Transfiera cuidadosamente el lisado completo a la columna QIAamp MinElute (en un tubo de lavado de 2 ml) sin mojar el borde, cierre la tapa y centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 minuto. Disponga la columna QIAamp MinElute en un tubo de lavado limpio de 2 ml (proporcionado) y deseche el tubo de lavado que contiene el líquido.

Si el lisado todavía no ha atravesado completamente la membrana tras el centrifugado, repita el centrifugado a una velocidad mayor hasta que la columna QIAamp MinElute quede vacía.

15. Abra con cuidado la columna QIAamp MinElute y añada 500 μ l de Buffer AW1 reconstituido procurando no humedecer el borde. Cierre la tapa y centrifugue a 6000 x g durante ≥ 1 minuto. Disponga la columna QIAamp MinElute en un tubo de lavado limpio de 2 ml y deseche el tubo de lavado que contiene el líquido.
16. Abra con cuidado la columna QIAamp MinElute y añada 500 μ l de Buffer AW2 reconstituido procurando no humedecer el borde. Cierre la tapa y centrifugue a 6000 x g durante ≥ 1 min. Disponga la columna QIAamp MinElute en un tubo de lavado limpio de 2 ml y deseche el tubo de lavado que contiene el líquido.

Debe evitarse el contacto entre la columna QIAamp MinElute y el líquido. Asegúrese de equilibrar el rotor de la centrifugadora. Algunos rotores de centrifugadora pueden vibrar durante la deceleración y hacer que el líquido que contiene etanol entre en contacto con la columna QIAamp MinElute. Tenga cuidado al retirar la columna QIAamp MinElute y el tubo de lavado del rotor, de modo que el líquido no entre en contacto con la columna QIAamp MinElute.

17. Centrifugue a velocidad máxima (aprox. 20 000 x g) durante unos 3 minutos para secar la membrana.

El arrastre de etanol hacia el eluido puede interferir en las aplicaciones posteriores.

18. Introduzca la columna QIAamp MinElute en un tubo de elución limpio de 1,5 ml (suministrado) y deseche el tubo de lavado que contiene el líquido. Abra con cuidado la tapa de la columna QIAamp MinElute y aplique de 20-200 µl de Buffer ATE en el centro de la membrana.

Importante: si utiliza volúmenes de elución pequeños (<50 µl), dispense el Buffer ATE en el centro de la membrana para asegurar la completa elución del ADN ligado. Las columnas QIAamp MinElute ofrecen flexibilidad a la hora de elegir el volumen de elución. Elija un volumen de acuerdo con los requisitos de la aplicación posterior. El volumen del eluido será aproximadamente 5 µl menor que el volumen de la solución de elución aplicada a la columna.

19. Cierre la tapa e incube a temperatura ambiente (15-25 °C) durante al menos 1 minuto. Centrifugue a velocidad máxima (aprox. 20 000 x g) durante ≥ 1 minuto.

El rendimiento del ADN podría aumentar si se incuba la columna QIAamp MinElute cargada con Buffer ATE durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente antes de la centrifugación.

Control de calidad

Conforme al sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit se somete a distintas pruebas en función de una serie de especificaciones predeterminadas con el fin de garantizar una calidad constante del producto.

Limitaciones

El rendimiento del kit se ha comprobado utilizando tejido FFPE para el aislamiento de ADN genómico.

Una fijación insuficiente o excesiva puede afectar la calidad del ADN y provocar un rendimiento insuficiente en ensayos anterógrados.

Los restos de formalina pueden inhibir el paso de digestión por la proteínasa K; asegúrese de deshidratar completamente las muestras antes de incorporarlas.

Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema con los procedimientos utilizados en cada laboratorio que no estén contemplados en los estudios de rendimiento de QIAGEN.

Para reducir al mínimo el riesgo de que se produzcan efectos negativos sobre los resultados diagnósticos, deben utilizarse controles apropiados para las aplicaciones posteriores. Para realizar validaciones adicionales se recomienda seguir las directrices de la International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH) detalladas en ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology.

Todo resultado diagnóstico que se genere debe interpretarse en combinación con otros datos clínicos o de laboratorio.

Mediante el uso del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, el ARN puede copurificarse con ADN si está presente en la muestra.

Características del rendimiento

Las características correspondientes del rendimiento se pueden encontrar en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com.

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir. Para obtener más información, también puede consultar la página de preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions) de nuestro Centro de servicio técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga sobre la información y/o los protocolos de este manual de uso, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

Columnas QIAamp MinElute obstruidas

- | | |
|---|---|
| a) Demasiado material inicial | Reduzca la cantidad de material inicial. Es fundamental usar la cantidad correcta de material inicial (consulte la página 17). |
| b) Temperatura de centrifugación demasiado baja | La temperatura de centrifugación debe ser 15-25 °C. Algunas centrifugadoras pueden enfriarse a menos de 15 °C incluso cuando la temperatura está ajustada en 20 °C. Esto puede provocar la formación de precipitado que puede obstruir las columnas QIAamp MinElute. Si sucede esto, ajuste la temperatura de centrifugación en 15–25 °C. |

Baja cantidad obtenida de ADN

- | | |
|--|---|
| a) Demasiado material inicial | La sobrecarga de la QIAamp MinElute Spin Column reduce significativamente el rendimiento de ácido nucleico. Reduzca la cantidad de material inicial (consulte la página 17). |
| b) ADN aún unido a la membrana de la RNeasy MinElute Spin Column | Repita la elución de ADN, pero incube la QIAamp MinElute Spin Column sobre la mesa durante 10 minutos con Buffer ATE (tampón de elución) antes de la centrifugación. |
| c) Almacenamiento incorrecto de tampones/reactivos | Las QIAamp MinElute Spin Columns deben almacenarse a una temperatura de 2-8 °C apenas llegue el kit. Compruebe la temperatura correcta de almacenamiento ya que la exposición a temperaturas más altas durante periodos de tiempo más prolongados podría resultar en la pérdida de funcionalidad. |

Valor A_{260}/A_{280} bajo

Se ha utilizado agua para diluir el ácido nucleico para medir el cociente A_{260}/A_{280}

Use 10 mM Tris Cl, pH 7,5, sin agua, para diluir la muestra antes de medir la pureza.











El ADN no tiene un buen rendimiento en las aplicaciones o ensayos anterógrados

Arrastre de etanol

Se requiere la centrifugación de las columnas QIAamp MinElute a máxima velocidad en dos pasos del procedimiento: Durante el segundo lavado con Buffer AW2, asegúrese de centrifugar a $\geq 8000 \times g$ durante 2 minutos a 15-25 °C para secar la membrana de la QIAamp MinElute Spin Column. Después de la centrifugación, retire con cuidado la columna del tubo de recogida para que no entre en contacto con el flujo continuo. Luego, coloque la columna en un tubo de recogida nuevo y centrifugue a máxima velocidad durante 5 minutos. También es necesario el centrifugado a máxima velocidad para reducir la muestra después del tratamiento con xileno y del paso de lavado con etanol.

Símbolos

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

Símbolo	Definición del símbolo
 Σ <N>	Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones
	Fecha de caducidad
	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
	Número de lote
	Número de material (es decir, etiquetado de los componentes)
	Componentes
	Contenido
	Número

Símbolo

Definición del símbolo

	Número mundial de artículo comercial
Rn	“R” es la revisión de las Instrucciones de uso y “n” es el número de revisión
	Limitación de temperatura
	Fabricante
	Consultar las instrucciones de uso
	Mantener alejado de la luz solar
	Advertencia/precaución
	Proteinasa K
	Azida sódica
	A su recepción
	Anotar la fecha actual tras añadir etanol al frasco

Símbolo	Definición del símbolo
EtOH	Etanol
ADD	Adición
GuHCl	Clorhidrato de guanidina
MALEIC ACID	Ácido maleico
UDI	Identificador único de dispositivo

Apéndice: Manipulación

Manipulación general

Al manipular los reactivos y las muestras, utilice siempre guantes de látex o de vinilo para evitar la contaminación procedente de la superficie de la piel o de un equipo de laboratorio con polvo. Las manos y el polvo pueden ser portadores de bacterias y hongos, y son fuentes comunes de contaminación. Cámbiese los guantes con frecuencia y mantenga los tubos cerrados. Procure evitar la contaminación microbiana de los reactivos del kit.

Material de plástico desechable

Se recomienda usar tubos de polipropileno estériles durante todo el procedimiento.

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de cat.
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, para la purificación de ADN genómico obtenido de tejidos incorporados en parafina		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparaciones de ADN: 50 columnas QIAamp MinElute, proteínasa K, tampones, tubos de lavado (2 ml), tubos de elución (1,5 ml), tubos de lisis (2 ml)	60404

Para obtener información actualizada sobre licencias y sobre exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el documento de instrucciones de uso del kit de QIAGEN correspondiente. Las instrucciones de uso del kit de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Historial de revisiones del documento

Revisión	Descripción
R1, junio de 2022	<ul style="list-style-type: none">● Actualización a la versión 2 del kit para el cumplimiento con el IVDR● Actualización de la sección Descripción y principio● Actualización de la sección Materiales necesarios pero no suministrados● Actualización de la sección Advertencias y precauciones● Actualización de la sección Almacenamiento y manipulación de reactivos● Actualización de la sección Guía de resolución de problemas● Actualización del Apéndice
R2, febrero de 2023	<ul style="list-style-type: none">● Actualización de la sección Manipulación y almacenamiento de material de muestra

Acuerdo de licencia limitada para el QIAamp DSP DNA 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. QIAGEN 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. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para usuarios de QIAGEN. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este panel ni su(s) uso(s) 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. QIAGEN renuncia específicamente a 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. QIAGEN 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 y/o con sus componentes.

Para consultar los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.).

Feb-2023 HB-3033-002 1130780ES © 2023 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

