



Plasma-SeqSensei™

Guía de preparación de muestras

Manual de instrucciones

Abril de 2022

Legenda de símbolos

| | | | |
|---|--------------------------------------|---|--------------------------|
|  | Fabricante |  | Precaución |
|  | Consúltense las instrucciones de uso |  | Manténgase seco |
|  | Limitación de temperatura |  | Limitación de la humedad |

Tabla de contenidos

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Introducción | 3 |
| 1.1 | PROPÓSITO PREVISTO | 3 |
| 1.2 | PROCEDIMIENTO | 4 |
| 2 | Reactivos, consumibles y equipos | 5 |
| 2.1 | MATERIAL NO PROPORCIONADO | 5 |
| 2.2 | CONSUMIBLES | 6 |
| 2.3 | EQUIPAMIENTO | 6 |
| 3 | Almacenamiento y manipulación | 8 |
| 3.1 | CONDICIONES DE ENVÍO | 8 |
| 3.2 | PRECAUCIONES DE MANIPULACIÓN GENERALES | 8 |
| 3.3 | ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES | 8 |
| 3.3.1 | MEDIDAS ESPECÍFICAS | 9 |
| 3.3.2 | MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO | 9 |
| 3.3.3 | PRECAUCIONES DE MANIPULACIÓN DE REACTIVOS | 10 |
| 3.3.4 | PRECAUCIONES DE SEGURIDAD Y CONTAMINACIÓN | 10 |
| 4 | Procedimiento | 13 |
| 4.1 | RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE SANGRE | 13 |
| 4.1.1 | INSTRUCCIONES DE PREPARACIÓN DEL PLASMA (SANGRE TOTAL) | 13 |
| 4.2 | PURIFICACIÓN DEL ADN CIRCULANTE DEL PLASMA | 15 |
| 4.3 | CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS (QUBIT™) | 21 |
| 5 | Asistencia técnica | 24 |
| 6 | Glosario y terminología | 25 |
| 7 | Bibliografía | 26 |
| 8 | Copyrights y marcas comerciales | 27 |

1 Introducción

Las células tumorales que sufren apoptosis, necrosis o secreción metabólica liberan pequeñas cantidades de su ADN en el flujo sanguíneo. La fracción de ADN libre circulante (cfDNA) específica del tumor se denomina ADN tumoral circulante (ctDNA) y contiene la información genética del tumor primario e incluso de las metástasis. Un gran número de estudios de investigación y ensayos han demostrado la aplicación clínica de los perfiles de ctDNA en diferentes etapas del tratamiento del cáncer, incluida la selección de la terapia, el pronóstico y el seguimiento (1).

Existen varias tecnologías basadas en NGS para la detección de ctDNA. Sin embargo, debido a los sesgos and errores de secuenciación y PCR, la mayoría de ellas no son adecuadas para la detección de variantes raras. Plasma-SeqSensei™ es una novedosa tecnología basada en NGS que implementa identificadores moleculares únicos (Unique Molecular Identifier, UID) en el procedimiento de secuenciación. Esto resulta en una importante reducción de los errores, lo que da lugar a una sensibilidad muy alta de la tecnología PSS (2).

Para conseguir una alta sensibilidad y unos resultados óptimos, la preparación del cfDNA a partir de muestras de sangre debe realizarse conforme al procedimiento validado que se describe en el ► capítulo 4 *Procedimiento*, página 13/30.

1.1 Propósito previsto

La finalidad de esta guía de preparación de muestras es ayudar a los usuarios de los PSS *Assay-Specific Kits* con la preparación del cfDNA a partir de muestras de sangre. Esta guía incluye los procedimientos de purificación de plasma, purificación de cfDNA y cuantificación de cfDNA con Qubit™. El flujo de trabajo comienza con las muestras de sangre recogidas en Streck Blood Collection Tubes® para su uso en aplicaciones de biopsia líquida, como Plasma-SeqSensei™ *Assay-Specific Kits* y tecnologías de secuenciación de última generación (Next-Generation Sequencing, NGS).

1.2 Procedimiento

El flujo de trabajo Plasma-SeqSensei™ se divide en varios pasos que hay que seguir. La Figura 1 describe este proceso e incluye los pasos para la preparación de muestras, así como información sobre las instrucciones de uso específicas que hay que seguir desde la extracción de sangre hasta los resultados de secuenciación.

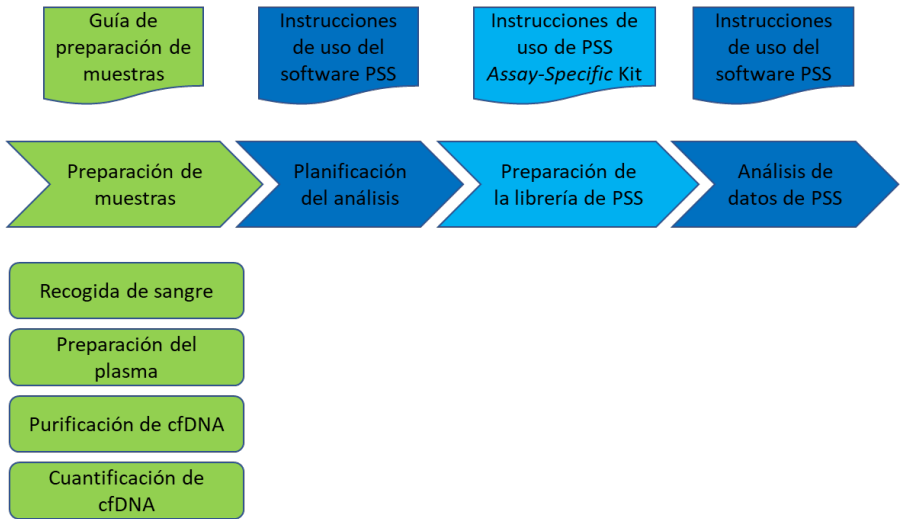


Figura 1: El proceso Plasma-SeqSensei™, incluidos los pasos del flujo de trabajo, se describen en la guía de preparación de muestras y en otros documentos complementarios.

2 Reactivos, consumibles y equipos

El flujo de trabajo descrito en esta guía requiere usar únicamente material que no se proporciona para preparar muestras de sangre para su uso con los Plasma-SeqSensei™ *Assay-Specific Kits*. Para conocer la descripción y el uso de los componentes del Plasma-SeqSensei™ *Assay-Specific Kit*, consulte las instrucciones de uso del Plasma-SeqSensei™ *Assay-Specific Kit* (www.sysmex-inostics.com).

2.1 Material no proporcionado

Los productos, cuya información sobre el fabricante/proveedor y el número de pedido se indican en Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 3 son fundamentales para el ensayo y no deben intercambiarse por productos de calidad o propiedades similares.

Tabla 1: Material esencial no proporcionado para la preparación de muestras según el flujo de trabajo Plasma-SeqSensei™

| Material | Productos |
|------------------|--|
| Reactivos y kits | * QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit, QIAGEN, n.º 55114 |
| | Etanol (EtOH) ≥99,8 %, para análisis |
| | 2-propanol ≥99,8 %, para análisis |
| | 1X Solución salina tamponada con fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS), (pH = 7,4 ± 0,2, sin Ca ²⁺ ni Mg ²⁺) |
| | * Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher, n.º Q33230 (100 rxns) o n.º Q33231 (500 rxns) |
| | * Tubos de ensayo Qubit™, Thermo Fisher, n.º Q32856 |

* Componentes fundamentales; no deben intercambiarse por productos de calidad o propiedades similares.

2.2 Consumibles

Tabla 2: Consumibles necesarios para la preparación de muestras según el flujo de trabajo Plasma-SeqSensei™

| Equipamiento de laboratorio | Producto |
|--------------------------------------|--|
| Sistema de recogida de sangre | * Streck Cell-Free DNA Blood Collection Tubes®, volumen de 10,0 ml (n.º 218996 de Streck para el paquete de 6 tubos; n.º 218997 de Streck para la caja de 100 tubos) |
| Puntas de pipeta/pipetas serológicas | Puntas de pipeta estériles resistentes a aerosoles con filtros de 10, 200 o 1.000 µl |
| | Pipeta serológica de 5, 10 o 25 ml, estéril |
| Tubos de reacción | Tubos de 50, 15, 2 y 1,5 ml |
| | * Tubos de ADN LoBind® de 1,5 ml, Eppendorf, n.º 0030108051 |
| | Vial criogénico de 5 ml |
| Equipo de seguridad | Gafas protectoras |
| | Batas, mangas, fundas desechables para zapatos y guantes protectores |
| Varios | * Tubos de extensión de 3 ml para bombas de vacío QIAvac, Qiagen, n.º 19587 |
| | * VacConnectors (500) para bombas de vacío QIAvac, Qiagen, n.º 19407 |

* Componentes fundamentales; no deben intercambiarse por productos de calidad o propiedades similares.

2.3 Equipamiento

Tabla 3: Equipamiento necesario para la preparación de muestras según el flujo de trabajo Plasma-SeqSensei™

| Equipamiento de laboratorio | Producto |
|-----------------------------|--|
| Instrumentos electrónicos | Centrífuga para tubos de 1,5/2 ml, capaz de alcanzar 20.000 × g, rotor de ángulo fijo |
| | Centrífuga para tubos de 15/50 ml, capaz de alcanzar 7.197 × g, rotor de ángulo fijo |
| | Centrífuga para la preparación del plasma, capaz de alcanzar 6.000 × g, rotor de cubeta basculante, rampa de baja deceleración/aceleración y adaptadores para tubos de 15 ml |

2 Reactivos, consumibles y equipos

| Equipamiento de laboratorio | Producto |
|-----------------------------|--|
| | Adaptadores para rotores de ángulo fijo para viales criogénicos de 5 ml |
| | Minicentrífuga, capaz de alcanzar $\leq 2.000 \times g$ |
| | Vortexer con inserciones para tubos y placas de 96 pocillos |
| | Termómetro |
| | Termobloque con inserciones para tubos de 2 ml |
| | Congelador, de $-15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ |
| | Refrigerador, de $2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ |
| | Ultracongelador, de $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ |
| | Estación de trabajo para ADN/cabina para PCR |
| | Campana de gases (muy aconsejable) |
| | Cabinas de seguridad biológica de clase II (muy aconsejables) |
| | * Qiagen Connecting System |
| | * QIAvac 24 Plus System |
| | Bomba de vacío (230 V, 50 Hz) |
| * Fluorómetro Qubit™ 3 o 4 | |
| Pipetas | Pipeta de 1.000 μl , 200 μl o 10 μl |
| | Pipeteador de 5 a 100 ml |
| Gradillas | Gradilla para tubos de 50 ml, 15 ml y 1,5/2 ml |
| | Cajas de almacenamiento para congelador |
| Varios | Cubeta para hielo |
| | Cronómetro |

* Componentes fundamentales; no deben intercambiarse por productos de calidad o propiedades similares.

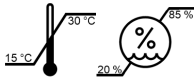
3 Almacenamiento y manipulación

3.1 Condiciones de envío

La preparación de la muestra de sangre para su uso con los Plasma-SeqSensei™ *Assay-Specific* Kits exige utilizar productos de terceros que no se proporcionan. Para conseguir unas condiciones óptimas de envío, siga las instrucciones del fabricante del material no proporcionado.

Importante: Independientemente de lo que digan las instrucciones del fabricante, las muestras recogidas en tubos Streck Cell-Free DNA BCT® no deben permanecer almacenadas durante más de 6 días.

3.2 Precauciones de manipulación generales



Asegúrese de que la temperatura y la humedad en los laboratorios permanezcan entre 15 °C y 30 °C y entre el 20 % y el 85 %, respectivamente (reduce el riesgo de condensación/evaporación).

No coma, beba ni fume en las distintas zonas del laboratorio. Lleve a cabo las operaciones de mantenimiento de los equipos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Descontamine y deseche todos los reactivos, muestras y suministros asociados de acuerdo con la normativa gubernamental aplicable a sus instalaciones. Para obtener resultados precisos y reproducibles, es esencial evitar la contaminación con ADN externo, especialmente de productos de PCR de muestras analizadas anteriormente. Los productos amplificados de experimentos anteriores constituyen la fuente más común de contaminación del ADN.

3.3 Advertencias y precauciones



Evite el contacto de los reactivos con la piel, los ojos y las mucosas. Para conocer otras advertencias, precauciones y medidas

3 Almacenamiento y manipulación

específicas adicionales, consulte la ficha de datos de seguridad (FDS) del fabricante.

3.3.1 Medidas específicas

Medidas de primeros auxilios:

- **Consejo general:** En caso de efectos persistentes, consulte a un médico. Quítese inmediatamente la ropa y los zapatos contaminados y lávelos bien antes de volver a utilizarlos.
- **Si se inhala:** Retire a la persona afectada de la zona cercana. Asegure una fuente de aire fresco.
- **En caso de contacto con la piel:** Lave la zona afectada con jabón y abundante agua.
- **En caso de contacto con los ojos:** Retire las lentes de contacto. Enjuague bien con agua corriente manteniendo los ojos bien abiertos durante al menos 10 o 15 minutos. Proteja el ojo no afectado.
- **Si se ingiere:** Llame inmediatamente a un médico. No provoque el vómito. No intente nunca que una persona que haya perdido el conocimiento ingiera algo.

3.3.2 Manipulación y almacenamiento

Medidas generales de higiene y protección

No coma, beba, ni fume en el laboratorio y asegúrese de lavarse bien las manos antes de salir. No inhale los vapores. Evite el contacto con los ojos y la piel. Quítese inmediatamente la ropa sucia o empapada.

Precauciones para una manipulación segura

Los riesgos de manipulación del producto deben reducirse adoptando las medidas de protección y preventivas adecuadas. El proceso de trabajo debe estar diseñado para descartar la liberación de las sustancias peligrosas o el contacto con la piel en la medida de lo posible.

Consejos sobre la protección contra incendios y explosiones

No se requieren medidas especiales.

Condiciones para un almacenamiento seguro, incluidas las posibles incompatibilidades



Mantenga el recipiente bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Los recipientes abiertos deberán sellarse con cuidado y mantenerse en posición vertical para evitar fugas.

3.3.3 Precauciones de manipulación de reactivos



Para garantizar el uso y la eliminación adecuados de los reactivos y para evitar su contaminación, siga las precauciones que se indican a continuación:

- No utilice reactivos caducados o almacenados incorrectamente.
- Prepare los reactivos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- Los reactivos deben utilizarse únicamente con los reactivos del mismo kit.
- Los reactivos de kits o lotes diferentes no se deben mezclar o intercambiar.
- Registre la fecha de apertura y marque los tubos después de cada uso para garantizar que los reactivos no estén caducados o se utilicen más allá del número recomendado de ciclos de congelación y descongelación.
- Evite la contaminación de los reactivos cambiándose de guantes con frecuencia. Cámbiese de guantes siempre que vaya a manipular reactivos y muestras diferentes.
- Deseche los reactivos no utilizados y los residuos de acuerdo con la normativa medioambiental nacional, federal, estatal y local.

3.3.4 Precauciones de seguridad y contaminación



Siga las precauciones enumeradas a continuación para mantener el entorno del laboratorio libre de contaminación con ADN y para garantizar la seguridad del personal:

- Separe los espacios de trabajo utilizados para las operaciones de laboratorio pre-PCR y post-PCR y siga un flujo de trabajo unidireccional que vaya de las zonas «limpias» (zonas anteriores a

3 Almacenamiento y manipulación

la amplificación) a las zonas «sucias» (zonas posteriores a la amplificación).

- Asegúrese de que en cada zona de trabajo haya equipos específicos (incluidas pipetas), suministros, reactivos, recipientes para residuos con riesgo biológico y manuales de laboratorio. Nunca intercambie estos materiales entre las zonas de trabajo pre-PCR y post-PCR. Recomendamos la codificación por colores o el etiquetado de los equipos, suministros y reactivos para identificar los que pertenezcan a una zona en concreto.
- Utilice el equipamiento de protección personal adecuado durante todo el procedimiento.
 - Lleve una bata de laboratorio (preferiblemente desechable) y guantes sin polvo desechables en todo momento cuando trabaje en las zonas de pre-PCR y post-PCR.
 - Para evitar cualquier contaminación, cámbiese de guantes con frecuencia cuando manipule diferentes muestras y reactivos y después de que la piel entre en contacto con la parte exterior de los guantes.
 - Utilice protección ocular durante la preparación del plasma y la purificación del ADN.
 - Utilice cubrezapatos desechables o cámbiese de calzado entre los laboratorios pre-PCR y post-PCR; asimismo, lleve puestas mangas protectoras desechables en los brazos (son necesarias en el laboratorio pre-PCR).
- Al salir de las zonas de laboratorio de pre-PCR y post-PCR, quítese y deseche el equipo de protección personal.
- Manipule todas las muestras como material potencialmente infeccioso. Si se produce un derrame, se recomienda limpiar el área afectada en primer lugar con un detergente/desinfectante y agua y, a continuación, con una solución de hipoclorito de sodio (lejía) al 0,5 % preparada utilizando agua desmineralizada.

Nota: *La lejía doméstica líquida comercial (p. ej., de la marca Clorox) suele contener hipoclorito de sodio con una concentración del 5,25 %. Una dilución 1:10 de lejía doméstica producirá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.*

- Utilice cabinas de PCR específicas para los pasos de pipeteo.

- Después de su uso, limpie las cabinas de PCR con un desinfectante de compuestos de amonio cuaternario (como RHEOSEPT-WD plus o equivalente) y, a continuación, con un producto diseñado para eliminar los ácidos nucleicos y las nucleasas (como Roti® libre de ácido nucleico o equivalente).
- Después de su uso, limpie los espacios de trabajo para PCR con un producto diseñado para eliminar los ácidos nucleicos y las nucleasas (como Roti® libre de ácido nucleico o equivalente).
- Descontamine las cabinas de PCR y el material de laboratorio (pipetas, gradillas para tubos u otros equipos) con luz ultravioleta (UV) después de su uso. Para garantizar la eficacia de la radiación UV, limpie regularmente las bombillas de luz UV de los residuos acumulados.
- Utilice únicamente puntas de pipeta estériles resistentes a aerosoles con filtro (de lotes certificados y sin ARNasa, ADNasa ni pirógenos).
- Utilice únicamente reactivos y tubos específicos para PCR.
- No tenga abiertos al mismo tiempo más de un tubo de muestra o un tubo de reactivo.
- Para evitar la contaminación de soluciones de reactivos que tengan varios usos, prepare alícuotas de trabajo de acuerdo con las instrucciones y evite el pipeteo directo.

4 Procedimiento

4.1 Recogida y procesamiento de sangre

Los Plasma-SeqSensei™ *Assay-Specific Kits* se han desarrollado con tubos de recogida de sangre Streck Cell-Free DNA BCT®. Recoja y manipule la sangre conforme a las instrucciones del fabricante. Los tubos Streck Cell-Free DNA BCT® se pueden utilizar para muestras que se envíen para analizarlas o para análisis internos de laboratorio.

Transporte la muestra a temperatura ambiente dentro de las 24 horas siguientes a la extracción de la sangre. Durante el transporte, evite las temperaturas inferiores a 6 °C y superiores a 37 °C.

4.1.1 Instrucciones de preparación del plasma (sangre total)

Inicie la preparación del plasma antes de que transcurran 6 días desde la fecha de extracción de la sangre. Los pasos de preparación del plasma deben realizarse con rapidez y de forma consecutiva, sin pausas entre los pasos individuales.

Tabla 4: Material necesario para la preparación del plasma a partir de sangre

| Material | Producto |
|-------------------------------|--|
| Sistema de recogida de sangre | * Streck Cell-Free DNA Blood Collection Tubes®, volumen de 10,0 ml (n.º 218996 de Streck para el paquete de 6 tubos; n.º 218997 de Streck para la caja de 100 tubos) |
| Puntas de pipeta | Puntas de pipeta estériles resistentes a aerosoles con filtros de 200 o 1.000 µl |
| Tubos de reacción | Tubos de 15 ml |
| | Vial criogénico de 5 ml |

1. Centrifugue el tubo de sangre a temperatura ambiente (entre 15 °C y 25 °C) durante 10 min a 1.600 × g con un rotor basculante.

Nota: *Para evitar la alteración de la capa de células, utilice una rampa de baja deceleración en la centrifuga.*

2. Después de la centrifugación, extraiga los tubos con cuidado de la centrifuga (evite las turbulencias).

3. Compruebe visualmente la fracción de plasma (sobrenadante).

Nota: *Puede formarse una capa fina de células para las muestras conservadas a una temperatura igual o inferior a 6 °C durante un período de tiempo extenso (>12 horas). Puede observarse hemólisis (plasma de color rosa claro o rojizo) para las muestras conservadas a una temperatura igual o superior a 37 °C durante un período de tiempo extenso (>24 horas).*

4. Sin alterar la capa de células, transfiera el plasma (sobrenadante) a un tubo cónico limpio de 15 ml; para ello, pipetee a lo largo de la pared del tubo con una pipeta monocal o una pipeta aforada desechable. Deje al menos 500 µl de plasma residual sobre la capa de células para evitar alterarla.

Nota: *Si se ha formado una capa fina de células, transfiera únicamente la fracción limpia de plasma y deje al menos 500 µl de plasma residual sobre la capa de células. Si en la muestra no existe una fracción limpia de plasma, transfiera al menos 2,5 ml de plasma de la parte superior.*

Importante: Desaconsejamos analizar muestras que presenten hemólisis debido al mayor riesgo de que exista un ruido de fondo intenso de ADN genómico.

5. Centrifugue el plasma en el tubo para centrifuga de 15 ml a temperatura ambiente (entre 15 °C y 25 °C) durante 10 min a 6.000 × g con un rotor basculante o de ángulo fijo para eliminar las células sanguíneas residuales.

Nota: *Utilice una rampa de baja deceleración en la centrifuga.*

6. Después de la centrifugación, extraiga los tubos con cuidado de la centrifuga (evite las turbulencias).
7. Sin alterar el sedimento celular, transfiera el plasma (sobrenadante) a un tubo limpio para centrifuga de 15 ml; para ello, pipetee a lo largo de la pared del tubo con una pipeta monocal o una pipeta aforada desechable. Deje un volumen residual de unos 300 µl (aprox. 7 mm) en el fondo del tubo para evitar la contaminación del plasma con células.
8. Mezcle pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5 veces usando una pipeta monocal de 1 ml de volumen.

4 Procedimiento

9. Transfiera el plasma a viales criogénicos previamente etiquetados.
10. Si no va a continuar directamente con los pasos de la sección «Purificación del ADN circulante del plasma», coloque inmediatamente los viales criogénicos con plasma en posición vertical dentro de un congelador a una temperatura entre -70 °C y -100 °C para su almacenamiento (hasta un máximo de 24 meses).

Nota: Las muestras de plasma congelado deben transportarse en hielo seco.

4.2 Purificación del ADN circulante del plasma

Para el PSS *Assay-Specific* Kit, la purificación del ADN libre circulante (cfDNA) del plasma debe realizarse con el QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit n.º 55114 (QIAGEN). Puede procesarse cualquier volumen de plasma por muestra entre 2 y 4 ml.

Importante: Aunque en el protocolo de QIAGEN se especifique lo contrario, no añada ARN portador durante el flujo de trabajo de purificación del ADN. Para la elución del ADN se sigue un procedimiento que consta de dos pasos.

Tabla 5: Material necesario para la purificación de cfDNA del plasma

| Material | Productos |
|--------------------------------------|--|
| Reactivos y kits | * QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit, QIAGEN, n.º 55114 |
| | Etanol (EtOH) ≥99,8 %, para análisis |
| | 2-propanol ≥99,8 %, para análisis |
| | 1X Solución salina tamponada con fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS), (pH = 7,4 ± 0,2, sin Ca ²⁺ ni Mg ²⁺) |
| Puntas de pipeta/pipetas serológicas | Puntas de pipeta estériles resistentes a aerosoles con filtros de 20, 200 o 1.000 µl |
| | Pipeta serológica de 5, 10 o 25 ml, estéril |
| Tubos de reacción | Tubos de 50, 15, 2 y 1,5 ml |
| | * Tubos de ADN LoBind® de 1,5 ml, Eppendorf, n.º 0030108051 |
| Varios | * Tubos de extensión de 3 ml para bombas de vacío QIAvac, Qiagen, n.º 19587 |
| | * VacConnectors (500) para bombas de vacío QIAvac, Qiagen, n.º 19407 |

Preparación:

- Ponga en marcha la cabina de bioseguridad y compruebe que funciona correctamente.
- Limpie la cabina de bioseguridad y el equipamiento con un producto diseñado para eliminar ADN (p. ej., DNA away) y un producto desinfectante (p. ej., EtOH al 70 %).
- Establezca la temperatura del baño María a 60 °C (± 1 °C) y compruebe la temperatura del agua con un termómetro externo.
- Establezca la temperatura del termobloque a 56 °C (± 1 °C) y compruebe la temperatura de los bloques con un termómetro externo.
- Compruebe el nivel de líquido en la botella de residuos líquidos del sistema de vacío. El nivel de líquido no debe superar la línea marcada.
- Compruebe el recipiente de residuos biopeligrosos. El recipiente de residuos sólidos biopeligrosos no debe estar lleno más de $\frac{3}{4}$ partes.
- Antes de comenzar a trabajar, encienda la bomba de vacío y compruebe si alcanza la presión de vacío necesaria (entre -800 y -900 mbar).

Cuando utilice un nuevo kit, prepare las soluciones como se describe a continuación.

Buffer ACB

- Antes de usarlo, añada 200 ml de isopropanol (2-propanol, $\geq 99,8$ %, para análisis) a 300 ml de Buffer ACB concentrado para obtener 500 ml de Buffer ACB. Mezcle bien.

Buffer ACW1

- Antes de usarlo, añada 25 ml de EtOH ($\geq 99,8$ %, para análisis) a 19 ml de Buffer ACW1 concentrado para obtener 44 ml de Buffer ACW1. Mezcle bien.

Buffer ACW2

- Antes de usarlo, añada 30 ml de EtOH ($\geq 99,8$ %, para análisis) a 13 ml de Buffer ACW2 concentrado para obtener 43 ml de Buffer ACW2. Mezcle bien.

4 Procedimiento

Purificación de ADN:

Los siguientes pasos se realizan en la zona de preparación de muestras en el laboratorio pre-PCR.

Nota: En los pasos siguientes, el símbolo ▲ indica volúmenes de muestra de 2,0-3,0 ml de plasma y el símbolo ●, volúmenes de muestra de 3,1-4,0 ml de plasma.

1. Deje que las muestras de plasma se descongelen durante unos 15 o 20 min hasta alcanzar la temperatura ambiente. No las mezcle ni las agite mediante vórtex.

Nota: El tiempo variará en función del volumen de la muestra y la temperatura ambiente. Una vez que las muestras se hayan descongelado (es decir, que no se observe hielo en el tubo), lleve a cabo inmediatamente los pasos siguientes.

2. Una vez que el plasma esté descongelado, examínelo para ver si presenta hemólisis.

Importante: Desaconsejamos analizar muestras que presenten hemólisis debido al mayor riesgo de que exista un ruido de fondo intenso de ADN genómico.

3. Prepare todos los reactivos. Llene un tubo de recogida (del QIAamp® Kit) con aprox. 1 ml de PBS para cada muestra (para ajustar el volumen de las alícuotas de plasma).

Nota: Prepare por separado un tubo con PBS para cada alícuota de muestra.

4. Marque el tubo con tapón de rosca y un tubo de 50 ml por muestra.
5. Para cada muestra de la prueba, pipetee ▲ 300 µl o ● 400 µl de QIAGEN Proteinase K en un tubo de 50 ml y colóquelo en la cabina de bioseguridad.
6. Centrifugue los viales criogénicos con plasma (que previamente deben haber alcanzado una temperatura entre 15 °C y 25 °C) a 1.000 × g con un rotor de ángulo fijo. Detenga la centrifugación una vez que se alcance esa velocidad.

Nota: Asegúrese de llevar a cabo los pasos siguientes (del 7 al 10) en una cabina de bioseguridad en el área pre-PCR.

7. Si el volumen de sobrenadante del plasma centrifugado es inferior a ▲ 3,0 ml o ● 4,0 ml, transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo y ajuste el volumen con PBS hasta alcanzar ▲ 3,0 ml o ● 4,0 ml.
8. Añada ▲ 3,0 ml o ● 4,0 ml de sobrenadante de plasma por muestra a los tubos correspondientes que contengan proteinasa K.

Nota: Durante el pipeteo, no altere el sedimento y deje unos 30 μ l de plasma en el fondo del tubo. **A la hora de combinar varias alícuotas, abra únicamente los tubos de un mismo paciente a la vez; es decir, los tubos de los que se vaya a extraer el plasma y el tubo que contenga la proteinasa K en el que se vaya a añadir el plasma.**

9. Añada ▲ 2,4 ml o ● 3,2 ml de Buffer ACL (sin ARN portador) y cierre el tapón.
10. Mezcle los tubos mediante vórtex de pulsos durante 30 s.

Nota: El término «vórtex de pulsos» significa mezclar mediante vórtex durante intervalos cortos de tiempo.

11. Realice una incubación a 60 °C (± 1 °C) en un baño María durante 60 min (± 2 min).
12. Al mismo tiempo, llene la cubeta para hielo con hielo o saque la gradilla fría del congelador a una temperatura entre -15 °C y -30 °C, y marque manualmente los tubos necesarios:
 - a. Una columna QIAamp® Mini por muestra.
 - b. Un tubo de 1,5 ml por muestra.

13. Añada ▲ 5,4 ml o ● 7,2 ml de Buffer ACB al lisado del tubo.
14. Vuelva a cerrar el tubo y mezcle bien el contenido mediante vórtex de pulsos durante entre 15 y 30 segundos.

Nota: Los siguientes pasos no dependen del volumen inicial de la muestra. No existen diferencias entre las muestras de 2-3 ml y 3,1-4 ml.

15. Incube las muestras en hielo o en la gradilla fría durante 5 min (± 1 min).
16. Al mismo tiempo, prepare el sistema de vacío QIAvac 24 Plus:

4 Procedimiento

- Coloque los VacConnectors en los huecos correspondientes.
 - Coloque las columnas QIAamp® Mini marcadas en los VacConnectors.
 - Coloque el extensor de columna (adaptador de extensión) en las columnas QIAamp® Mini.
17. Tras realizar la incubación en hielo, centrifugue el tubo de muestra a $7.000 \times g$ durante 30 s para quitar el condensado del tapón.
 18. Con la válvula principal de vacío aún cerrada, encienda la bomba de vacío (ajustada a un valor entre -800 y -900 mbar).
 19. Transfiera con cuidado el lisado al extensor de columna (con una pipeta serológica). Deseche los tubos.

Nota: *Para evitar la contaminación cruzada, no mueva la pipeta por encima de los extensores de columna de las otras columnas QIAamp Mini.*

20. Asegúrese de que la presión de vacío esté dentro del rango entre -800 y -900 mbar.
21. Abra la válvula principal de vacío y deje que el lisado fluya completamente a través de la columna.
22. Cierre la válvula principal de vacío (el vacío permanecerá activo) y **mantenga la presión de vacío** en el sistema QIAvac 24 Plus.
23. Pipetee 600 µl de Buffer ACW1 en el extensor de columna.

Nota: *Para evitar la contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta nueva para cada muestra y no mueva las puntas de pipeta por encima de los extensores de columna de las otras muestras.*

24. Abra la válvula principal de vacío y deje que el tampón fluya completamente a través de la columna.
25. Cierre la válvula principal de vacío (el vacío permanecerá activo) y **elimine el vacío** del sistema QIAvac 24 Plus. Retire el extensor de columna y deséchelo.

Nota: *Para evitar la contaminación cruzada, tenga cuidado de no quitar los extensores de columna de las otras muestras/columnas.*

26. Añada 750 µl de Buffer ACW2 a la columna QIAamp® Mini.

Nota: *Para evitar la contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta nueva para cada muestra y no trabaje encima de las columnas QIAamp® Mini que contengan las otras muestras.*

27. Abra la válvula principal de vacío y deje que el tampón fluya completamente a través de la columna.

28. Cierre la válvula principal de vacío (el vacío permanecerá activo) y **elimine el vacío** del sistema QIAvac 24 Plus.

29. Añada 750 µl de EtOH (≥99,8 %, para análisis) a la columna QIAamp® Mini.

Nota: *Para evitar la contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta nueva para cada muestra y no trabaje encima de las columnas QIAamp® Mini que contengan las otras muestras.*

30. Abra la válvula principal de vacío y deje que el EtOH fluya completamente a través de la columna.

31. Cierre la válvula principal de vacío y apague la bomba de vacío.

32. Cierre la columna QIAamp® Mini, extráigala del sistema QIAvac 24 Plus y deposítela en un tubo de recogida de 2 ml. Deseche los VacConnectors.

33. Centrifugue las muestras en una centrifuga Eppendorf 5430, u otra equivalente, a la velocidad máxima (20.000 × g) durante 3 min (± 0,5 min).

34. Coloque la columna QIAamp® Mini en un tubo de recogida nuevo de 2 ml. Deseche el tubo de 2 ml usado.

35. Abra las tapas e incube el conjunto dentro de un termobloque a 56 °C (± 1 °C) durante 10 min (± 1 min) para secar la membrana completamente.

36. Coloque las columnas QIAamp® Mini en tubos de elución limpios de 1,5 ml y deseche los tubos de recogida de 2 ml.

37. Añada con cuidado 70 µl de Buffer AVE en el centro de la membrana, sin tocar la membrana.

Nota: *Utilice una punta de pipeta nueva para cada muestra.*

4 Procedimiento

38. Cierre la tapa e incube a temperatura ambiente (entre 15 °C y 25 °C) durante 3 min (\pm 0,5 min).
39. Centrifugue en una centrifuga Eppendorf 5430, u otra equivalente, a la velocidad máxima (20.000 \times g) durante 1 min para eluir los ácidos nucleicos.
40. Sin tocar la membrana, añada otros 70 μ l de Buffer AVE en el centro de la membrana.
Nota: *Utilice una punta de pipeta nueva para cada muestra.*
41. Cierre la tapa e incube a temperatura ambiente (entre 15 °C y 25 °C) durante 3 min (\pm 0,5 min).
42. Centrifugue en una centrifuga Eppendorf 5430, u otra equivalente, a la velocidad máxima (20.000 \times g) durante 1 min para eluir los ácidos nucleicos.
43. Deseche la columna QIAamp® Mini.
44. Conserve el cfDNA en el laboratorio pre-PCR a una temperatura entre 2 °C y 8 °C hasta 24 horas o entre -15 °C y -30 °C durante períodos de almacenamiento más extensos. El ADN purificado será estable durante, como mínimo, 1 año.

4.3 Cuantificación de muestras (Qubit™)

El Qubit™ Assay se utiliza para cuantificar cantidades de cfDNA extraídas de muestras de plasma. Los valores de ADN se expresan en ng/ μ l.

Nota: *La medición de las muestras con Qubit es meramente una primera aproximación del contenido de ADN de partida para determinar la carga de la muestra. La cuantificación final de las muestras, que posiblemente presente diferencias, tendrá lugar durante la secuenciación de la librería mediante el cuantificador interno (Quantispike).*

Los PSS Assay-Specific Kits se han desarrollado con el Qubit™ 1X dsDNA HS Assay (rango del ensayo: 10 pg/ μ l a 100 ng/ μ l).

Tabla 6: Material necesario para la cuantificación de muestras con Qubit™

| Material | Productos |
|------------------|--|
| Reactivos y kits | * Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher, n.º Q33230 (100 rxns) o n.º Q33231 (500 rxns) |
| | * Tubos de ensayo Qubit™, Thermo Fisher, n.º Q32856 |
| Puntas de pipeta | Puntas de pipeta estériles resistentes a aerosoles con filtros de 2, 10, 20 o 200 µl |

Los siguientes pasos se realizan en la zona de preparación de muestras en el laboratorio pre-PCR.

Medición con Qubit™:

Lleve a cabo el protocolo conforme a lo descrito en el manual proporcionado por el fabricante, utilizando para ello 5 µl de muestra (consulte la Tabla 7).

Tabla 7: Determinación de la concentración de ADN con Qubit™

| | ADN de partida | Solución de trabajo de Qubit™ 1X dsDNA HS (componente A) |
|----------------|----------------|--|
| Patrón | 10 µl | 190 µl |
| Muestra | 5 µl | 195 µl |

Calcule el **ADN de partida total**:

ADN de partida por muestra = concentración medida en ng/µl * 116 µl

ADN de partida total

$$= \sum \text{concentraciones medidas de todas las muestras}$$

Nota: Cada **control positivo** contiene **4,3 ng de ADN**; esto es algo que habrá que tener en cuenta para calcular el ADN total de partida de cada carrera de secuenciación. El módulo «Run Planning» (Planificación del análisis) del PSS Software incluirá automáticamente el ADN del control positivo en el cálculo.

4 Procedimiento

El cfDNA purificado se puede conservar en el laboratorio pre-PCR a una temperatura entre 2 °C y 8 °C hasta 24 horas o entre -15 °C y -30 °C durante períodos de almacenamiento más extensos. El ADN purificado será estable durante, como mínimo, 1 año.

Siguientes pasos:

Consulte las instrucciones de uso del Software PSS para planificar el análisis y las instrucciones de uso del PSS *Assay-Specific* Kit para preparar la librería de secuenciación (consulte la Figura 1).

5 Asistencia técnica

Si se producen problemas durante la preparación de muestras, consulte la guía de solución de problemas del fabricante, si está disponible, o póngase en contacto con el fabricante del producto para solicitar asistencia.

6 Glosario y terminología

| Término | Definición |
|---------|---------------------------------------|
| BCT | Tubos de recogida de sangre |
| cfDNA | ADN libre circulante |
| ctDNA | ADN tumoral circulante |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| EtOH | Etanol |
| IFU | Instrucciones de uso |
| NGS | Secuenciación de última generación |
| PBS | Solución salina tamponada con fosfato |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PSS | Plasma-SeqSensei™ |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| FDS | Ficha de datos de seguridad |
| UID | Identificador único |
| UV | Ultravioleta |

7 Bibliografía

- 1) Stewart CM, Kothari PD, Mouliere F, Mair R, Somnay S, Benayed R, Zehir A, Weigelt B, Dawson SJ, Arcila ME, Berger MF, Tsui DW. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):616-627. doi: 10.1002/path.5048. Epub 2018 Mar 12. PMID: 29380875; PMCID: PMC6656375.
- 2) Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 7;108(23):9530-5. doi: 10.1073/pnas.1105422108. Epub 2011 May 17. PMID: 21586637; PMCID: PMC3111315.

8 Copyrights y marcas comerciales

Queda prohibida la reproducción no autorizada del contenido de este manual, total o parcialmente, sin la autorización previa por escrito de Sysmex Corporation, Japón.

Plasma-SeqSensei™ es una marca comercial de Sysmex Corporation, Japón.

Todas las demás marcas comerciales, nombres y productos son, aunque no estén específicamente marcados como tales, marcas comerciales o marcas registradas de sus respectivos propietarios.





Sysmex Inostics GmbH
Falkenried 88
20251 Hamburg, Alemania
www.sysmex-inostics.com
© 2022 Sysmex Inostics

Abril de 2022
SPIFU.R1