

cobas[®] DNA Sample Preparation Kit

Para diagnóstico *in vitro*



cobas[®] DNA Sample Preparation Kit

24 Tests

M/N: 05985536190

TABLA DE CONTENIDO

Uso previsto	3
Principios del procedimiento	3
Preparación de las muestras.....	3
Materiales y reactivos.....	4
Materiales y reactivos suministrados.....	4
Almacenamiento y manipulación de los reactivos	7
Material adicional necesario	7
Precauciones y requisitos de manipulación	8
Advertencias y precauciones.....	8
Buenas prácticas de laboratorio.....	8
Contaminación	9
Integridad	9
Eliminación de residuos	9
Limpieza de derrames.....	9
Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras.....	10
Recogida y manipulación de muestras	10
Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras	10
Almacenamiento y estabilidad de las muestras procesadas	10
Procedimiento de preparación de las muestras	10
Utilización del kit	10
Instrucciones de uso	10
Cuantificación del ADN.....	14
Información adicional	15
Símbolos	15
Asistencia técnica	16
Fabricante y distribuidor.....	16
Marcas registradas y patentes	16
Copyright.....	16
Bibliografía	16
Revisión del documento.....	17

Uso previsto

El cobas® DNA Sample Preparation Kit se utiliza para la preparación manual de muestras con el objetivo de aislar el ADN genómico de las muestras de tejido tumoral impregnado en parafina y fijado en formalina (FFPET).


Principios del procedimiento



Preparación de las muestras

El procesamiento de las muestras FFPET y el aislamiento del ADN se lleva a cabo mediante el cobas® DNA Sample Preparation Kit, una preparación manual de muestras genéricas basada en la unión de ácidos nucleicos a fibras de vidrio. A continuación, se realiza la lisis de una sección de 5 µm desparafinada de una muestra de FFPET mediante su incubación a una temperatura elevada con una proteasa y un buffer de lisis/unión caotrópico que liberan ácidos nucleicos y protegen el ADN genómico que liberan de las DNasas. Posteriormente se añade isopropanol a la mezcla de lisis y se centrifuga mediante una columna con un filtro de fibra de vidrio. Durante la fase de centrifugación, el ADN genómico se une a la superficie del filtro de fibra de vidrio. Las sustancias no fijadas, como sales, proteínas y otros desechos, se eliminan durante la centrifugación. Los ácidos nucleicos absorbidos se lavan y, a continuación, se eluyen con una solución acuosa. La cantidad de ADN genómico puede determinarse espectrofotométricamente y ajustarse según una concentración establecida.

Materiales y reactivos

Materiales y reactivos suministrados

Kit/Casetes	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia ^a
cobas® DNA Sample Preparation Kit 24 pruebas (M/N: 05985536190)	DNA TLB (Buffer de lisis del tejido de ADN) (M/N: 05517613001) Buffer Tris-HCl Cloruro potásico 0,04 % de EDTA 0,1 % de detergente no iónico ^b 0,09 % de azida sódica	1 × 10 ml	N/D
	PK (Proteinasa K) (M/N: 05860695102) Proteinasa K, liofilizada ^b	1 × 100 mg	 <p>PELIGRO</p> <p>H315: Provoca irritación cutánea. H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H319: Provoca irritación ocular grave. H334: Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. H335: Puede irritar las vías respiratorias. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/ los vapores/el aerosol. P264: Lavarse la piel concienzudamente tras la manipulación. P280: Llevar guantes/gafas/máscara de protección. P284: Llevar equipo de protección respiratoria. P304 + P340 + P312: EN CASO DE INHALACIÓN: transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico en caso de malestar. P342 + P311: En caso de síntomas respiratorios: llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. 39450-01-6 Proteinasa, serina de <i>Tritirachium album</i></p>

Kit/Casetes	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia ^a
cobas® DNA Sample Preparation Kit 24 pruebas (M/N: 05985536190)	DNA PBB (Buffer de unión de ADN en parafina) (M/N: 05517621001) Buffer Tris-HCl 49,6% de hidrocloreuro de guanidina ^b 0,05 % de urea 20 % de detergente no iónico ^b	1 × 10 ml	 <p>PELIGRO H302: Nocivo por ingestión. H315: Provoca irritación cutánea. H318: Provoca lesiones oculares graves. P264: Lavarse la piel concienzudamente tras la manipulación. P270: No comer, beber ni fumar durante su utilización. P280: Llevar guantes/gafas/máscara de protección. P301 + P312 + P330: EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico en caso de malestar. Enjuagarse la boca. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: lavar con agua y jabón abundantes. P305 + P351 + P338 + P310: 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. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada. 50-01-1 Guanidina, hidrocloreuro (1:1) 9002-92-0 Polidocanol</p>
	WB I (Buffer de lavado de ADN I) (M/N: 05517656001) Buffer Tris-HCl 64% de hidrocloreuro de guanidina ^b	1 × 25 ml	 <p>ADVERTENCIA H302 + H332: Nocivo en caso de ingestión o inhalación. H315: Provoca irritación cutánea. H319: Provoca irritación ocular grave. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/ los vapores/el aerosol. P264: Lavarse la piel concienzudamente tras la manipulación. P280: Llevar guantes/gafas/máscara de protección. P304 + P340 + P312: EN CASO DE INHALACIÓN: transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico en caso de malestar. P337 + P313: Si persiste la irritación ocular: consultar a un médico. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada. 50-01-1 Cloruro de guanidina</p>

Kit/Casetes	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia ^a
cobas® DNA Sample Preparation Kit 24 pruebas (M/N: 05985536190)	WB II (Buffer de lavado de ADN II) (M/N: 05517664001) Buffer Tris-HCl Cloruro sódico	1 × 12,5 ml	N/D
	DNA EB (Buffer de elución de ADN) (M/N: 05517630001) Buffer Tris-HCl 0,09 % de azida sódica	1 × 6 ml	N/D
	FT (Tubos de filtrado con tapones) (M/N: 05089506102)	1 × 25 ud.	N/D
	CT (Tubos de obtención de muestras) (M/N: 05880513001)	3 × 25 ud.	N/D

^a Las etiquetas de seguridad del producto se basan fundamentalmente en la regulación GHS de la UE.

^b Sustancias peligrosas.

Almacenamiento y manipulación de los reactivos

Reactivo	Temperatura de almacenamiento	Periodo de almacenamiento
cobas® DNA Sample Preparation Kit	Entre 15 °C y 30 °C	Una vez abierto, se mantiene estable para 8 usos durante 90 días o hasta la fecha de caducidad indicada, lo que se produzca primero.

Nota: a excepción del reactivo **PK**, no congele los reactivos.

Nota: antes de utilizarlos, revise visualmente todos los reactivos para asegurarse de que no muestran signos de fugas. No utilice el material si hay alguna evidencia de fuga.

después de añadir agua estéril libre de nucleasas al reactivo **PK**, almacene el reactivo **PK** reconstituido no usado en alícuotas de 450 µl a una temperatura de -20 °C. Una vez reconstituido, el reactivo **PK** debe utilizarse en un plazo de 90 días o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra antes. Después de añadir el etanol absoluto, almacene los reactivos **WB I** y **WB II** a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C. Estas soluciones de trabajo permanecen estables durante 90 días o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra antes.

Material adicional necesario

Materiales	P/N
Xileno (ACS, ≥ 98,5 % de xilenos)	Cualquier proveedor
Etanol absoluto (prueba 200, para biología molecular)	Cualquier proveedor
Isopropanol (ACS, ≥ 99,5 %)	Cualquier proveedor
Agua estéril libre de nucleasas (para grado de biología molecular)	Cualquier proveedor
Lejía	Cualquier proveedor
Etanol al 70 %	Cualquier proveedor
Pipetas serológicas estériles y desechables de 5 ml y 25 ml	Cualquier proveedor
Pipeteadores ajustables* (capacidad de pipeteo entre 5 y 1.000 µl)	Cualquier proveedor
Puntas de pipeta exentas de DNasa con filtro para aerosol o de desplazamiento positivo	Cualquier proveedor
Pipet-Aid™*	Cualquier proveedor
Microcentrífuga de mesa de trabajo* (centrifugado a 20.000 × g)	Cualquier proveedor
Dos bloques de calor seco para calentar tubos para microcentrífuga a una temperatura de 56 °C y 90 °C*	Cualquier proveedor
Tubos para microcentrífuga con tapa de bloqueo (capacidad de 1,5 ml, estériles, exentos de RNasa/DNasa y grado PCR)	Cualquier proveedor
Bandejas de tubos para microcentrífuga	Cualquier proveedor
Espectrofotómetro para medir la concentración de ADN*	Cualquier proveedor
Agitador vórtex*	Cualquier proveedor
Congelador que permita el almacenamiento de -25 °C a -15 °C	Cualquier proveedor
Termómetros calibrados para el bloque de calor seco*	Cualquier proveedor
Baño de agua* capaz de mantener la temperatura a 37 °C	Cualquier proveedor
Cuchilla de un solo filo o similar	Cualquier proveedor
Guantes de laboratorio sin talco desechables	Cualquier proveedor

* Debe realizarse un correcto mantenimiento del equipo, según lo establecido en las instrucciones del fabricante.

Para obtener más información sobre el material de venta independiente, póngase en contacto con su representante local de Roche.

Precauciones y requisitos de manipulación

Advertencias y precauciones

Como sucede con cualquier procedimiento analítico, resulta esencial seguir las buenas prácticas de laboratorio recomendadas para obtener un rendimiento correcto del kit de preparación de muestras.

- Para diagnóstico in vitro exclusivamente.
- Puede solicitar Hojas de Datos de Seguridad (Safety Data Sheets, SDS) en las oficinas locales de Roche.
- Todas las muestras deben tratarse como material infeccioso, por lo que deben aplicarse procedimientos de laboratorio seguros como los descritos en la publicación Biosafety in Microbiological Laboratories¹ y en el documento M29-A4 del CLSI.²
- Los reactivos **DNA PBB** y **DNA TLB** contienen un detergente no iónico, que es un irritante de las membranas mucosas. Evite el contacto con los ojos, la piel y las membranas mucosas.

Nota: *la lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25 %. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.*

- El xileno es una sustancia química peligrosa y debe utilizarse en una campana de gases. Deséchelo en un contenedor de residuos químicos según la reglamentación local, estatal y federal.
- Se recomienda la utilización de pipetas estériles desechables y puntas de pipetas exentas de DNasa.
- Siga al pie de la letra los procedimientos y las directrices que se suministran para garantizar la correcta preparación de la muestra. Cualquier variación de dichos procedimientos y directrices podría afectar al rendimiento óptimo de la prueba.
- Informe a la autoridad competente local de cualquier incidente grave que pueda tener lugar durante la realización del ensayo.

Buenas prácticas de laboratorio

- No pipetee con la boca.
- No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo del laboratorio.
- Lávese a conciencia las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit.
- Utilice guantes de laboratorio, batas de laboratorio y protección ocular cuando manipule los reactivos. Evite el contacto de estos materiales con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua. Pueden producirse quemaduras si no se actúa adecuadamente. Si se producen derrames, diluya las manchas con agua antes de secarlas con un paño.
- Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo del laboratorio usando una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 0,5 % en agua destilada o desionizada (lejía doméstica diluida a 1:10). A continuación, límpielas con un trapo impregnado en etanol al 70 %.

Nota: *la lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25 %. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.*

Contaminación

- A fin de evitar la contaminación, es obligatorio el uso de guantes durante la manipulación de las muestras y los reactivos para el cobas® DNA Sample Preparation Kit, así como cambiarse los guantes entre un proceso y otro. Evite la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras.
- Cámbiese los guantes con frecuencia para reducir las posibilidades de contaminación.
- Cámbiese los guantes antes de salir de las áreas de aislamiento de ADN o si entra en contacto con soluciones o una muestra que pudieran estar contaminadas.
- Evite la contaminación microbiana y con ribonucleasa de los reactivos.
- Los materiales y equipos utilizados deben dedicarse exclusivamente a cada actividad y no usarse para otras actividades ni transferirse de un área a otra. Por ejemplo, los pipeteadores y suministros para el aislamiento de ADN no deben utilizarse para preparar reactivos para la amplificación y la detección.
- Se recomienda utilizar flujos de trabajo de laboratorio unidireccionales y completar una actividad antes de pasar a la siguiente. Por ejemplo, debe completarse el aislamiento de ADN antes de empezar con el proceso de amplificación y detección. El aislamiento de ADN debe realizarse en una zona distinta de en la que se lleve a cabo la amplificación y la detección.

Integridad

- No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- No mezcle reactivos de kits o lotes distintos.
- No utilice elementos desechables caducados.
- Todos los elementos desechables son de un solo uso. No deben reutilizarse.
- Debe realizarse un correcto mantenimiento del equipo, de acuerdo con lo establecido en las instrucciones del fabricante.

Eliminación de residuos

- Los reactivos DNA EB y DNA TLB contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Cuando elimine soluciones que contengan azida sódica vertiéndolas en fregaderos de laboratorio, deje correr abundante agua fría para evitar la formación de depósitos de azida.
- Deseche los reactivos no utilizados y los residuos según la reglamentación nacional, federal, estatal y local.

Limpieza de derrames

- Los reactivos DNA PBB y WB I contienen hidrocloreuro de guanidina. Si se vierte líquido que contenga este buffer, límpielo con detergente apto para laboratorio y agua. Si se vierte líquido que contenga agentes potencialmente infecciosos, limpie el área afectada primero con detergente para laboratorio y agua y luego con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.

Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras

Nota: manipule todas las muestras como si pudieran transmitir agentes infecciosos.

Recogida y manipulación de muestras

El cobas® DNA Sample Preparation Kit se ha desarrollado para su uso con muestras de FFPET.

Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras

Las muestras de FFPET se pueden transportar a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C. El transporte de las muestras de FFPET debe cumplir las reglamentaciones nacionales, federales, estatales y locales para el transporte de agentes etiológicos.³

Para obtener información sobre recomendaciones para el almacenamiento, consulte el apartado **Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras** de las instrucciones de uso específicas del ensayo.

Almacenamiento y estabilidad de las muestras procesadas

Consulte el apartado **Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras** de las Instrucciones de uso específicas del ensayo para conocer las recomendaciones de almacenamiento.

El ADN extraído debería utilizarse en los periodos de almacenamiento recomendados o antes de la fecha de caducidad del cobas® DNA Sample Preparation Kit utilizado para la extracción del ADN, lo que ocurra primero.

Antes de utilizar stocks de ADN extraído y almacenado, agite y centrifugue los tubos de elución que contienen dichos stocks.

Procedimiento de preparación de las muestras

Utilización del kit

Ilustración 1 Flujo de trabajo del cobas® DNA Sample Preparation Kit

1	Extraiga las muestras y los reactivos del almacenamiento.
2	Desparafinice las muestras.
3	Lleve a cabo el aislamiento del ADN.
4	Eluya el ADN.

Instrucciones de uso

Nota: el cobas® DNA Sample Preparation Kit ha sido desarrollado para su uso con secciones de FFPET con un grosor de 5 µm.

Nota: las pruebas de detección de mutaciones pueden tener requisitos específicos para el contenido tumoral y necesitar macrodissección después de la desparafinación.

Nota: los bloques de calor en seco que permiten calentar los tubos para microcentrífuga con tapa de bloqueo deben encenderse y establecerse en 56 °C y 90 °C.

Preparación y almacenamiento de los reactivos

Prepare los reactivos de trabajo como se muestra en la tabla siguiente antes de utilizar el kit por primera vez. Utilice una pipeta serológica de 5 ml para dispensar el agua. Utilice pipetas serológicas de 25 ml para dispensar el etanol. Si la proteinasa K se ha reconstituido y congelado previamente, descongele una cantidad suficiente de alícuotas para procesar el número de muestras que se van a analizar.

Reactivos	Reconstitución/Preparación
Proteinasa K (PK)	Reconstituya el reactivo PK añadiendo 4,5 ml de agua estéril libre de nucleasas (grado PCR) al vial mediante una pipeta serológica estéril y desechable de 5 ml. Mezcle el contenido invirtiendo el vial de 5 a 10 veces. Transfiera una parte alícuota de 450 µl de PK reconstituida a tubos para microcentrifuga de 1,5 ml con tapa de bloqueo y almacénelos a -20 °C durante un máximo de 90 días o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra primero. Si la PK se ha reconstituido y congelado previamente, descongele una cantidad suficiente de alícuotas para procesar el número de muestras que se van a analizar (se necesitan 70 µl de PK reconstituida para cada muestra).
Wash Buffer I (WB I)	Prepare el buffer WB I de trabajo añadiendo 15 ml de etanol absoluto a la botella de WB I . Mezcle bien invirtiendo la botella entre 5 y 10 veces. Anote en la botella que se ha añadido etanol y la fecha correspondiente. Almacene el reactivo WB I a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C hasta 90 días o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra antes.
Wash Buffer II (WB II)	Prepare el buffer WB II de trabajo añadiendo 50 ml de etanol absoluto a la botella de WB II . Mezcle el contenido invirtiendo la botella de 5 a 10 veces. Anote en la botella que se ha añadido etanol y la fecha correspondiente. Almacene el reactivo WB II a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C hasta 90 días o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra antes.

Todas las soluciones almacenadas a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C deben ser claras. Si detecta algún precipitado en los reactivos, caliente la solución en agua a 37 °C hasta que se disuelva el precipitado. No utilice el reactivo hasta se haya disuelto el precipitado por completo.

Desparafinación de las secciones de FFPET colocadas en portaobjetos

Nota: *el xileno es una sustancia química peligrosa. Todos los pasos del proceso de desparafinación deben realizarse en una campana de gases. Consulte el apartado **Advertencias y precauciones**.*

- Añada un portaobjetos con una sección de FFPET de 5 µm a un contenedor con xileno suficiente para cubrir el tejido y déjelo en remojo durante 5 minutos.
- Transfiera el portaobjetos a un contenedor con etanol absoluto suficiente para cubrir el tejido y déjelo en remojo durante 5 minutos.
- Retire el portaobjetos del etanol y deje secar la sección completamente (de 5 a 10 minutos).
- Lleve a cabo la macrodissección en caso necesario.
- Etiquete un tubo para microcentrifuga con tapa de bloqueo de 1,5 ml para cada muestra con la información de identificación de la muestra.
- Añada 180 µl de reactivo **DNA TLB** al tubo para microcentrifuga con tapa de bloqueo de 1,5 ml.
- Añada 70 µl de **PK** reconstituida al tubo para microcentrifuga con tapa de bloqueo que contiene **DNA TLB**.
- Retire el tejido del portaobjetos e introdúzcalo en el tubo para microcentrifuga con tapa de bloqueo. Sumerja el tejido en la mezcla de **DNA TLB/PK**.
- Proceda con el paso 1 del apartado **Procedimiento de aislamiento de ADN**.

Desparafinación de las secciones de FFPET no colocadas en portaobjetos

Nota: *el xileno es una sustancia química peligrosa. Todos los pasos del proceso de desparafinación deben realizarse en una campana de gases. Consulte el apartado **Advertencias y precauciones**.*

Nota: *si la muestra requiere macrodissección, debe colocarse la sección en un portaobjetos y llevar a cabo el procedimiento que se detalla en el apartado **Desparafinación de las secciones de FFPET colocadas en portaobjetos**.*

1. Coloque una sección de FFPET de 5 µm en un tubo para microcentrífuga con tapa de bloqueo de 1,5 ml etiquetado con la información de identificación de la muestra para cada muestra.
2. Añada 500 µl de xileno a un tubo para microcentrífuga con tapa de bloqueo que contenga la sección de FFPET.
3. Mezcle bien el contenido mediante un agitador vórtex durante 10 segundos.
4. Deje reposar el contenido del tubo durante 5 minutos a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C.
5. Añada 500 µl de etanol absoluto y mezcle el contenido mediante un agitador vórtex durante 10 segundos.
6. Deje reposar el contenido del tubo durante 5 minutos a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C.
7. Centrifugue a una velocidad de entre 16.000 × g y 20.000 × g durante 2 minutos. Extraiga el sobrenadante sin disgregar el sedimento. Deseche el sobrenadante en un contenedor de residuos químicos.
8. Añada 1 ml de etanol absoluto y mezcle el contenido con un agitador vórtex durante 10 segundos.
9. Centrifugue a una velocidad de entre 16.000 × g y 20.000 × g durante 2 minutos. Extraiga el sobrenadante sin disgregar el sedimento. Deseche el sobrenadante en un contenedor de residuos químicos.
10. Si el sedimento flota en el sobrenadante que queda, vuelva a centrifugar a 16.000-20.000 × g durante 1 minuto. Elimine todo resto de sobrenadante.
11. Seque el sedimento de tejido durante 10 minutos a 56 °C en un bloque de calentamiento con el tubo abierto.
12. Asegúrese de que el etanol se haya evaporado totalmente y de que el sedimento esté seco antes de proceder con el paso siguiente.
13. En caso necesario, los sedimentos secos pueden almacenarse hasta 24 horas a una temperatura de 2 °C a 8 °C.
14. Resuspenda el sedimento de tejido en 180 µl de **DNA TLB**.
15. Añada 70 µl de **PK** reconstituida.
16. Proceda con el paso 1 del siguiente apartado: **Procedimiento de aislamiento de ADN**.

Procedimiento de aislamiento de ADN

Nota: *si así se requiere para la prueba, procese un control negativo simultáneamente a las muestras. Prepare el control negativo mediante la combinación de 180 µl de **DNA TLB** y 70 µl de solución de **PK** en un tubo para microcentrífuga con tapa de bloqueo de 1,5 ml etiquetado como **NEG**. El control negativo se debe procesar siguiendo el mismo procedimiento que con las muestras.*

1. Mezcle el contenido de los tubos que contienen la muestra o la mezcla de **DNA TLB/PK** y la mezcla de control negativo (**NEG**) mediante un agitador vórtex durante 30 segundos.

Nota: *el tejido debe sumergirse totalmente en la mezcla de **DNA TLB/PK**.*

2. Coloque los tubos en el bloque de calor seco a 56 °C e incúbelo durante 60 minutos.
3. Mezcle el contenido de los tubos mediante un agitador vórtex durante 10 segundos.

Nota: *el tejido debe sumergirse totalmente en la mezcla de **DNA TLB/PK**.*

4. Coloque los tubos en el bloque de calor seco a 90 °C e incúbelo durante 60 minutos.

Nota: durante la incubación, prepare el número requerido de tubos de filtrado (FT) con tapones de bisagras colocando el FT en un tubo de obtención de muestras (CT) y etiquetando cada tapón de FT con la identificación adecuada de la muestra o el control.

Nota: cada muestra necesita 1 tubo FT, 3 tubos CT y 1 tubo de elución (tubo para microcentrifuga con tapa de bloqueo de 1,5 ml).

Nota: durante la incubación, etiquete el número requerido de tubos de elución (tubos para microcentrifuga de 1,5 ml) con la identificación adecuada de la muestra o el control.

5. Deje que los tubos se enfríen hasta alcanzar los 15-30 °C. Una vez enfriados, realice una centrifugación rápida de los tubos para recoger el exceso de líquido de los tapones.

6. Añada 200 µl de DNA PBB a cada tubo y mezcle el contenido moviendo la pipeta verticalmente 3 veces.

7. Incube los tubos a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C durante 10 minutos.

8. Añada 100 µl de isopropanol a cada tubo y mezcle el lisado moviendo la pipeta verticalmente 3 veces.

9. Transfiera cada lisado al tubo FT/CT debidamente etiquetado.

10. Centrifugue los tubos FT/CT a 8.000 × g durante 1 minuto.

11. Coloque cada tubo FT en un tubo CT nuevo. Deseche el flujo del tubo CT anterior en un contenedor de residuos químicos y elimine el CT usado como corresponde.

12. Añada 500 µl de reactivo WB I de trabajo a cada tubo FT.

Nota: en el apartado *Preparación de los reactivos* se describe cómo preparar el reactivo WB I de trabajo.

13. Centrifugue los tubos FT/CT a 8.000 × g durante 1 minuto.

14. Deseche el flujo de cada tubo CT en el contenedor de residuos químicos. Vuelva a colocar el tubo FT en el mismo tubo CT.

15. Añada 500 µl de reactivo WB II de trabajo a cada tubo FT.

Nota: en el apartado *Preparación de los reactivos* se describe cómo preparar el reactivo WB II de trabajo.

16. Centrifugue los tubos FT/CT a 8.000 × g durante 1 minuto.

17. Coloque cada tubo FT en un tubo CT nuevo. Deseche el flujo del tubo CT anterior en un contenedor de residuos químicos y elimine el CT usado como corresponde.

18. Centrifugue los tubos FT/CT a 16.000-20.000 × g durante 1 minuto para secar las membranas de los filtros.

19. Coloque cada tubo FT en un tubo de elución (tubo para microcentrifuga de 1,5 ml) etiquetado previamente con la identificación de la muestra o el control. Deseche el flujo del tubo CT usado en un contenedor de residuos químicos y elimine el CT usado como corresponde.

20. Añada 100 µl de reactivo DNA EB en el centro de cada membrana del tubo FT, pero sin tocarla.

21. Incube el tubo FT con el tubo de elución a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C durante 5 minutos.

22. Centrifugue el tubo FT con el tubo de elución a 8.000 × g durante 1 minuto para obtener la solución de elución en el tubo de elución. Elimine adecuadamente el tubo FT usado.

23. Cierre el tapón del tubo de elución. El tubo de elución contiene el stock de ADN.

24. Para la cuantificación del ADN, siga las instrucciones del apartado **Cuantificación del ADN**.

Nota: la medición de la concentración de ADN debe realizarse inmediatamente después del procedimiento de aislamiento de ADN y antes del almacenamiento.

Cuantificación del ADN

1. Mezcle cada stock de ADN mediante un agitador vórtex durante 5 segundos.
2. Cuantifique el ADN mediante un espectrofotómetro, según el protocolo del fabricante. Utilice el reactivo DNA EB como blanco para el equipo. Es necesario un promedio de dos lecturas coincidentes.

Nota: si las lecturas de concentración de ADN son $\geq 20,0$ ng/ μ l, las dos mediciones no deben presentar una diferencia mayor a ± 10 % entre ellas. En el caso de las lecturas de concentración de ADN $< 20,0$ ng/ μ l, la diferencia entre ambas mediciones no debe superar los ± 2 ng/ μ l. Si las dos mediciones presentan una diferencia mayor a ± 10 % entre ellas cuando las lecturas de concentración de ADN son $\geq 20,0$ ng/ μ l o mayor a ± 2 ng/ μ l cuando las lecturas de concentración de ADN son $< 20,0$ ng/ μ l, se deben realizar 2 lecturas adicionales hasta que se cumplan los requisitos. A continuación, debe calcularse el promedio de estas dos nuevas mediciones.

Nota: si se requiere el proceso completo de un control negativo (NEG), no es necesario medir el stock de ADN para NEG.

Nota: el ADN extraído y almacenado debería amplificarse en los periodos de almacenamiento recomendados en las instrucciones de uso específicas del ensayo o antes de la fecha de caducidad del cobas® DNA Sample Preparation Kit utilizado para la extracción del ADN, lo que ocurra primero.





















































Nota: para obtener información sobre la concentración de ADN requerida para el análisis, consulte las instrucciones de uso específicas del ensayo.

Información adicional

Símbolos

Los símbolos siguientes se emplean en el rotulado de todos los productos de diagnóstico por PCR de Roche.

Tabla 1 Símbolos utilizados en las etiquetas de los productos para diagnóstico mediante PCR de Roche

 Age/DOB Edad o fecha de nacimiento	 Dispositivo no apto para pruebas cerca del paciente	 QS IU/PCR UI de QS por reacción de PCR, utilice las unidades internacionales (UI) de QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.
 SW Software auxiliar	 Dispositivo no apto para autoexamen	 SN Número de serie
 Assigned Range [copies/mL] Intervalo asignado (copias/ml)	 Distribuidor <i>(Nota: el país o la región se indicará debajo de este símbolo.)</i>	 Site Centro
 Assigned Range [IU/mL] Intervalo asignado (UI/ml)	 No deben reutilizarse	 Procedure Standard Procedimiento estándar
 EC REP Representante autorizado en la Comunidad Europea	 Mujeres	 STERILE EO Esterilizado con óxido de etileno
 BARCODE Hoja de datos del código de barras	 Para evaluación del rendimiento IVD únicamente	 Almacenar en la oscuridad
 LOT Código de serie	 GTIN Global Trade Item Number (número mundial de un artículo comercial)	 Límite de temperatura
 Riesgo biológico	 Importador	 TDF Archivo de definición de pruebas
 REF Número de catálogo	 IVD Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Este lado hacia arriba
 CE Marcado CE de conformidad; este dispositivo cumple con los requisitos aplicables para el marcado CE de un producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> .	 LLR Límite inferior del intervalo asignado	 Procedure UltraSensitive Procedimiento ultrasensible
 Collect Date Fecha de recogida	 Hombres	 UDI Identificación exclusiva del dispositivo
 Consulte las instrucciones de uso	 Fabricante	 ULR Límite superior del intervalo asignado
 Suficiente para <n> pruebas	 CONTROL - Control negativo	 Urine Fill Line Línea de llenado de orina
 CONTENT Contenido del kit	 Sin esterilizar	 Rx Only Solamente para EE. UU.: la ley federal de los Estados Unidos solo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo autorizado o bajo prescripción médica.
 CONTROL Control	 Nombre del paciente	 Fecha de caducidad
 Fecha de fabricación	 Número del paciente	
 Dispositivo para pruebas cerca del paciente	 Abrir aquí	
 Dispositivo para autoexamen	 CONTROL + Control positivo	
	 QS copies / PCR Copias QS por reacción de PCR, utilice copias QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.	

Asistencia técnica

Para obtener asistencia técnica, póngase en contacto con su filial local:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Fabricante y distribuidor

Tabla 2 Fabricante y distribuidor



Roche Diagnostics GmbH
 Sandhofer Strasse 116
 68305 Mannheim, Germany
www.roche.com

Fabricado en los EE. UU.

Distributed by Roche Diagnostics
 9115 Hague Road
 Indianapolis, IN 46250-0457 USA
 (For Technical Assistance call the
 Roche Response Center
 toll-free: 1-800-526-1247)¹

¹ Solamente para EE. UU.

Marcas registradas y patentes

COBAS es una marca registrada de Roche.

El resto de nombres de productos y marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios.

Consulte <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

Copyright

©2021 Roche Molecular Systems, Inc.



Bibliografía

1. Chosewood LC, Wilson DE. Biosafety and microbiological and biomedical laboratories-Fifth Edition. US Department of Health and Human Services Publication, CDC. 2009;21-1112.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA; CLSI, 2014.
3. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 60th Edition. 2019.

Revisión del documento

Información de revisión del documento	
Doc Rev 2.0 12/2021	<p>Se ha revisado para cumplir con los requisitos del reglamento IVDR.</p> <p>Se ha actualizado la página de símbolos armonizados.</p> <p>Se ha incluido la declaración "Fabricado en".</p> <p>Se ha actualizado la dirección del distribuidor.</p> <p>Se ha actualizado el apartado Marcas registradas y patentes.</p> <p>Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.</p>

Puede consultar el resumen del informe de seguridad y rendimiento en el siguiente enlace:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>