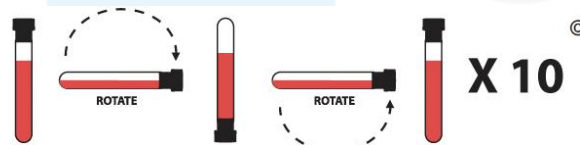


Protocolo de recogida de muestras para detección del ADN libre de células derivado de donante (dd-cfDNA) según ensayo AlloSeq cfDNA

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

- **Momento de recolección de las muestras:** Las muestras deben extraerse antes de la biopsia programada por sospecha clínica, **en el momento de la hospitalización** (visita 0). Es importante que la extracción se realice antes de la biopsia para no alterar los valores de dd-cfDNA.
- **Cantidad de sangre y formato de recolección:** La toma de sangre deberá ser de **16 ml por paciente**, utilizando **2 tubos "Cell-Free DNA BCT"** (cada tubo rellanado con 8 ml). Es importante utilizar este tubo para no alterar los valores de dd-cfDNA en la muestra durante su almacenaje.

Una vez recolectada la sangre, **retire el tubo del adaptador y mezcle inmediatamente por inversión suave de 8 a 10 veces**. Una inversión es un giro completo de la muñeca de 180 grados, y volver hacia atrás según la figura a continuación:



La mezcla inadecuada o retrasada puede conllevar a resultados analíticos incorrectos o un rendimiento deficiente del producto. En caso de duda, consultar instrucciones de obtención de muestra proporcionadas por el fabricante (Streck, en <https://www.streck.com>).

- **Conservación y transporte:** Los Tubos "Streck Cell-Free DNA BCT" se pueden conservar a **temperatura ambiente (18-25 grados) durante un máximo de 7 días**. En ese plazo de días debe realizarse el protocolo de doble centrifugación para la extracción del plasma.

Para proceder al envío de la muestra de sangre total en **servicio de transporte se debe realizar a temperatura ambiente**. Asegúrese la muestra llegue al laboratorio de destino dentro de los 7 días de estabilidad. Si por el contrario prefiere acumular muestras, proceda con los pasos de separación y congelación de plasma detallados a continuación.



OBTENCIÓN DE PLASMA

- **Protocolo de doble centrifugación:** Se debe seguir el protocolo de **doble centrifugación** descrito a continuación para poder obtener el plasma partiendo de los tubos de sangre total extraídos:

1. **Centrifugar** los tubos Streck durante 10 minutos a 1.600g.

2. **Aspirar el sobrenadante** con una pipeta y traspararlo a un nuevo tubo (o varios eppendorfs de 1,5mL). Se podrán obtener aproximadamente 4-5mL de plasma de cada tubo.

3. **Ultracentrifugar** el tubo con el sobrenadante durante 10 minutos a 16.000g.

4. Sin arrastrar el pellet de restos celulares, volver a **pipetear el sobrenadante a un nuevo tubo** de 15 o 50 ml. Es fundamental evitar cualquier arrastre del *buffy coat* o del botón de células durante el aspirado del sobrenadante.

En caso de duda, consultar instrucciones de obtención de separación de plasma proporcionadas por el fabricante (Streck, en <https://www.streck.com>).

- **Conservación y transporte:** El plasma así obtenido debe **conservarse entre -20 y -80°C**. Evitar someter el plasma a ciclos de congelación-descongelación. En el momento requerido, proceder al envío de las muestras de plasma congeladas en servicio de **transporte en hielo seco**.