



Junio de 2022

# Instrucciones de uso del QIASymphony® DSP Circulating DNA Kit (características del rendimiento)

Versión 2



Para uso diagnóstico in vitro

Para su uso con el QIASymphony DSP Circulating DNA Kit



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemania

R1

Encontrará las características del rendimiento disponibles en formato electrónico en la pestaña de recursos de la página de productos en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Introducción general

El sistema QIASymphony DSP Circulating DNA constituye un sistema *in vitro* listo para usar para la purificación cualitativa de ADN circulante libre (ccfDNA, Circulating Cell-Free DNA) procedente de plasma y orina humanos.

El QIASymphony DSP Circulating DNA Kit se han diseñado para utilizarse exclusivamente en combinación con el instrumento QIASymphony SP.

El QIASymphony DSP Circulating DNA Kit proporciona reactivos para la purificación completamente automatizada y simultánea de ccfDNA de una amplia variedad de tipos de plasma humano (con estabilizadores del perfil de ccfDNA, p. ej., Cell-Free DNA BCT® de Streck® y también sin estabilizadores del perfil de ccfDNA, p. ej., tubos con EDTA) y orina humana (con y sin estabilizadores del perfil de ccfDNA). Sin embargo, la característica de rendimiento para cada tubo de recogida de sangre no se ha especificado y debe ser validada por el usuario.

El ccfDNA purificado es compatible con una amplia variedad de aplicaciones posteriores, como sustancias químicas de la PCR, ensayos de cuantificación basados en fluorescencia o NGS.

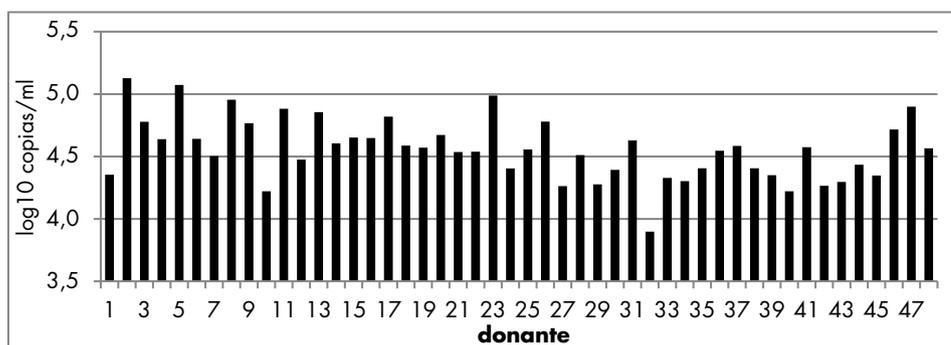
El instrumento QIASymphony SP realiza todos los pasos del procedimiento de purificación. En una sola serie se procesan hasta 96 muestras, en lotes de 24. Puede ser necesario un pretratamiento manual de las muestras de orina.

Nota: Las características del rendimiento dependen en gran medida de varios factores y están relacionadas con la aplicación posterior específica. Se ha establecido para el QS DSP Circulating DNA Kit junto con aplicaciones posteriores ejemplares. Sin embargo, se utilizan métodos para aislar los ácidos nucleicos de la muestra biológica como punto de inicio del parámetro de rendimiento de varias aplicaciones posteriores, por ejemplo, es necesario establecer la contaminación cruzada y la precisión de la serie de cualquier flujo de trabajo como parte del desarrollo de la aplicación posterior. Por lo tanto, es responsabilidad del usuario validar el flujo de trabajo completo para establecer los parámetros de rendimiento adecuados.

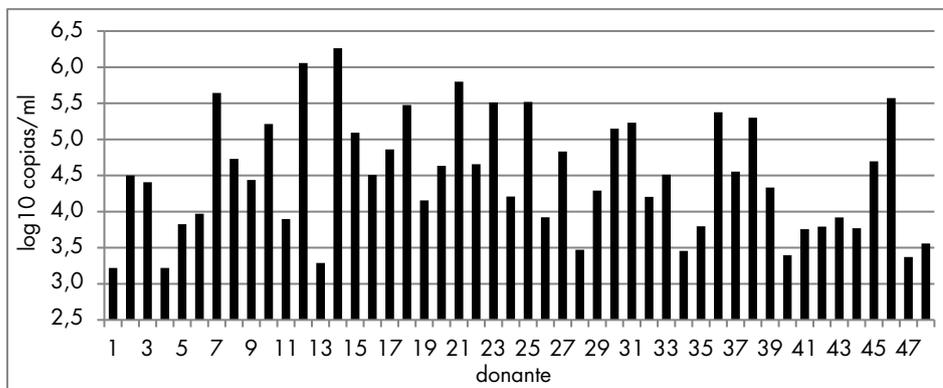
## Rendimiento básico

El rendimiento básico del QIASymphony DSP Circulating DNA Kit se evaluó utilizando 48 donantes individuales para la extracción de ccfDNA de 4 ml de plasma Streck y de 4 ml de orina estabilizada. Se ha determinado la cantidad de ccfDNA con un ensayo interno de real-time PCR para la secuencia de codificación de ARN ribosómico 18S.

La diferencia de las cantidades ( $\log_{10}$  copias/ml) en la figura 1 (4 ml de plasma) y la figura 2 (4 ml de orina) refleja las concentraciones de ccfDNA dependientes en gran medida del donante y que normalmente se encuentran en el mismo volumen del respectivo material de muestra.



**Figura 1. Cantidad de ccfDNA a partir de plasma procedente de 48 donantes individuales.** La donación de sangre de 48 donantes individuales se realizó en Cell-Free DNA BCT (Streck). Se extrajo ccfDNA de 4 ml de plasma con el QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. El ccfDNA obtenido se cuantificó con un ensayo interno de real-time PCR para la secuencia de codificación 18S. Los resultados se calcularon como copias objetivo por mililitro de plasma introducido.



**Figura 2. Cantidad de cfDNA a partir de orina procedente de 48 donantes individuales.** La orina recogida de 48 donantes individuales se estabilizó con Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck). Se extrajo el CcfDNA de 4 ml de orina con el QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit. El ccfDNA obtenido se cuantificó con un ensayo interno de real-time PCR para la secuencia de codificación 18S. Los resultados se calcularon como copias objetivo por mililitro de orina introducida.

## Precisión de la serie

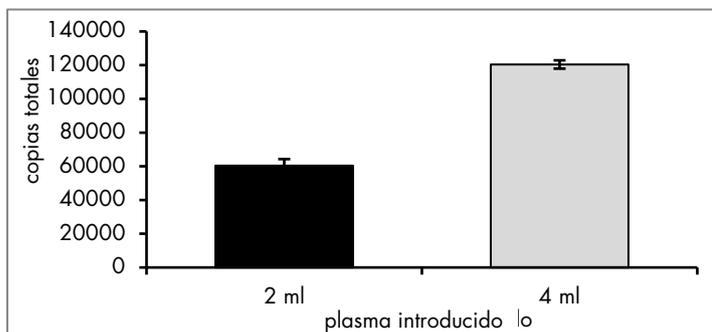
Se determinaron los coeficientes de variación (CV) para la extracción de cfDNA humano a partir de plasma con EDTA. Para el análisis de la precisión, el ccfDNA se cuantificó con un ensayo interno de real-time PCR para la secuencia de codificación ribosómica 18S. En total, se realizaron 10 series con el instrumento QIAAsymphony en 4 lotes (8 duplicaciones por lote). Los datos de precisión se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1. Análisis de los cálculos de precisión**

Precisión	CV (%)
Intralote	11,67
Repetibilidad	13,14
Precisión intermedia	13,14
Precisión total	14,12

## Rendimiento equivalente de los protocolos de 2 y 4 ml

El rendimiento equivalente de los protocolos de introducción de muestras de 2 y 4 ml se evaluó para el QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit mediante ccfDNA endógeno extraído de una mezcla de plasma humano con EDTA. En total, se realizaron 8 series independientes con el instrumento QIAAsymphony, cada una en 4 lotes con 8 duplicaciones por lote. Se ha determinado el intervalo lineal del procedimiento con el QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit para la secuencia de codificación 18S utilizando un ensayo interno de real-time PCR (figura 3). El cociente de la diferencia de los protocolos de 2 y 4 ml se muestra en la tabla 2 (el protocolo de referencia es la muestra introducida de 4 ml).



**Figura 3. Rendimiento equivalente utilizando el protocolo de introducción de muestras de 2 y 4 ml.** El intervalo lineal del protocolo de ccfDNA se determinó mediante protocolos de 2 y 4 ml. El ccfDNA se cuantificó con un ensayo interno de real-time PCR para la secuencia de codificación 18S. Los resultados se calcularon como copias totales por protocolo.

**Tabla 2. Diferencia entre los protocolos de 2 y 4 ml (n = 256)**

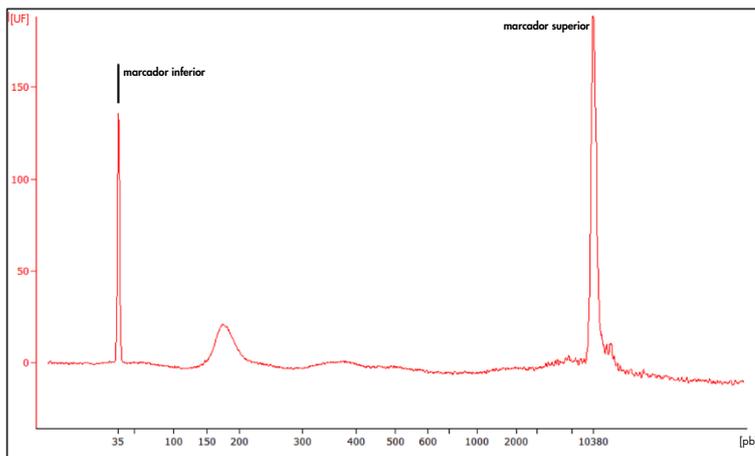
Parámetro	Valor
Cociente estimado de la media geométrica en copias/ml calculadas	1,01
Límite inferior del intervalo de confianza del 95%	0,92
Límite superior del intervalo de confianza del 95%	1,11
Precisión total	14,12

El rendimiento de los protocolos para una introducción de muestras de 2 y 4 ml, medido en copias calculadas por mililitro, es equivalente.

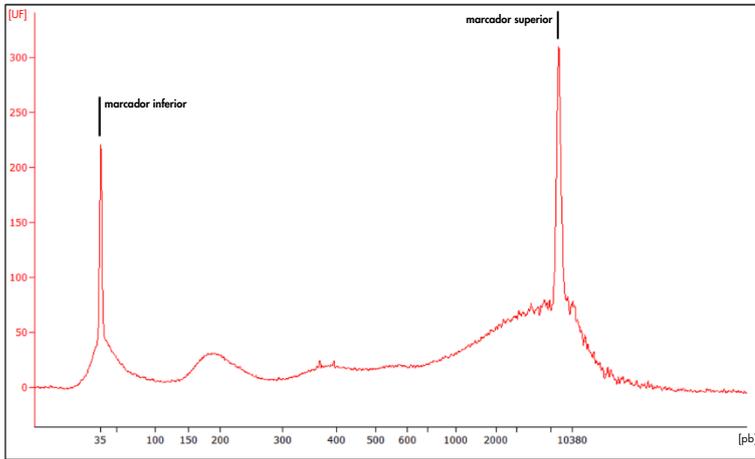
## Distribución del tamaño

Para evaluar la distribución de tamaños de los resultados de las muestras, se extrajo ccfDNA de muestra introducidas de 4 ml utilizando el QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, se eluyó en 75 µl y, a continuación, 1 µl del eluido se sometió a un análisis de tamaño con el Agilent® 2100 Bioanalyzer utilizando un Agilent High Sensitivity DNA Chip. Se realizaron un total de 5 duplicados independientes. Se muestra un perfil de ADN representativo para plasma en la [figura 4](#) y para orina en la [figura 5](#).

El electroferograma para plasma en la [figura 4](#) muestra el pico observado con frecuencia a aproximadamente 165 pb, que abarca desde 145 pb a 196 pb y que corresponde al intervalo de longitud del ADN unido a histonas en el nucleosoma. El electroferograma para orina en la [figura 5](#) muestra que el pico predominante a aproximadamente 160 pb es más ancho, abarcando entre 145 y 250 pb aproximadamente. Asimismo, para orina existe un segundo pico desde 20 hasta 100 pb aproximadamente (a nivel del pico marcador inferior) que indica la presencia de una fracción de ccfDNA con un mayor grado de fragmentación. Además, la [figura 5](#) muestra un número elevado de fragmentos de ADN largos a partir de aproximadamente 2 kb. La abundancia de estos fragmentos de ADN genómico se detecta con frecuencia en muestras de orina, probablemente debido a la liberación de ADN genómico por las células presentes en orina.



**Figura 4. Distribución de tamaños de ccfDNA procedente de plasma (perfil de Bioanalyzer).** El ccfDNA se extrajo de 4 ml de plasma con EDTA mediante el QIASymphony DSP Circulating DNA Kit; se sometió 1 µl del eluido a un análisis con Agilent High Sensitivity DNA Chip. Eje x: tamaño de la pareja de bases (pb); eje y: unidades de fluorescencia (UF).

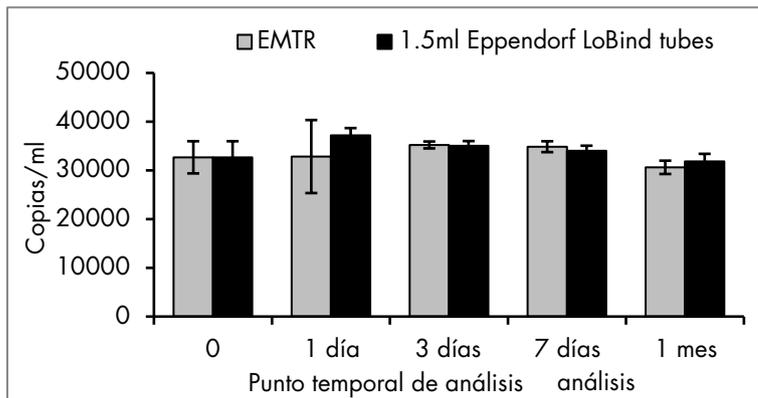


**Figura 5. Distribución de tamaños de ccfDNA procedente de orina (perfil de Bioanalyzer).** El ccfDNA se extrajo de 4 ml de orina mediante el QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit; se sometió 1 µl del eluido a un análisis con Agilent High Sensitivity DNA Chip. Eje x: tamaño de la pareja de bases (pb); eje y: unidades de fluorescencia (UF).

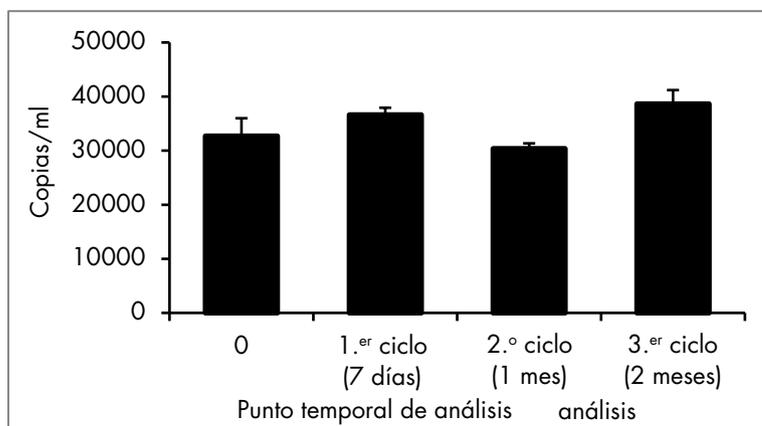
## Estabilidad del eluido

Se evaluó la estabilidad del eluido para el QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit mediante ccfDNA extraído de una mezcla de plasma humano con EDTA. Los eluidos se conservaron en gradillas de elución de 2 formatos diferentes: QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; n.º de catálogo 19588) y 1.5 ml Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock tubes. Los eluidos se analizaron en duplicados de 8. La estabilidad del ADN en los eluidos se determinó con un ensayo interno de real-time PCR para la secuencia de codificación de ARN ribosómico 18S.

La estabilidad del eluido a 2-8 °C no se vio afectada por un período de conservación de hasta un mes ni por el formato de conservación (figura 6). La estabilidad del ADN en tubos LoBind no se vio afectada por una conservación a -15 °C hasta -30 °C que incluyó 3 ciclos de congelación y descongelación después de 7 días, un mes y dos meses (figura 7).



**Figura 6. Estabilidad del ccfDNA en eluidos conservados a 2-8 °C en 2 formatos de tubo.** El ccfDNA se extrajo de plasma con EDTA mediante el QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit y se conservó a 2-8 °C para diferentes puntos temporales del análisis. El ccfDNA se cuantificó con un ensayo interno de real-time PCR para la secuencia de codificación 18S. Los resultados se calcularon como copias objetivo por mililitro de plasma introducido.



**Figura 7. Estabilidad del ccfDNA en eluidos almacenados a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , incluidos 3 ciclos de congelación y descongelación.** El ccfDNA se extrajo de plasma con EDTA mediante el QIASymphony DSP Circulating DNA Kit y se almacenó a una temperatura de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  en 1.5 ml Eppendorf LoBind tubes. La cantidad de ccfDNA se determinó en 3 puntos temporales de análisis utilizando el mismo eluido con 3 ciclos de congelación y descongelación. El ccfDNA se cuantificó con un ensayo interno de real-time PCR para la secuencia de codificación 18S. Los resultados se calcularon como copias objetivo por mililitro de plasma introducido.

## Sustancias interferentes

Se añadieron plasma y orina humanos con diferentes sustancias interferentes posibles (consulte la tabla 3) para analizar el impacto en el rendimiento de la extracción de ccfDNA del QS DSP Circulating DNA Kit y la posterior compatibilidad con ensayos anterógrados ejemplares. Los eluidos se analizaron mediante una real-time PCR interna para la secuencia de codificación 18S y con el Qubit® Fluorometer mediante un ensayo de ADNbc de alta sensibilidad.

**Tabla 3. Concentraciones de prueba de posibles sustancias interferentes**

Sustancias interferentes	Plasma	Orina
Bilirrubina	200 mg/litro*	200 mg/litro*
Hemoglobina	2 g/litro <sup>1</sup>	-
BSA y gammaglobulina	Hasta 120 g/litro*	1 g/litro <sup>†</sup>
Triglicéridos	5 g/litro*	-
Glucosa	10 g/litro*	10 g/litro*
Sangre	-	1% <sup>†</sup>
pH	-	pH 4 y pH 9 <sup>†</sup>

\* CLSI EP7-A2 Vol. 25 N.º 27

<sup>†</sup> Borrador de directrices de la FDA (11.05.2011)

Ninguna de las sustancias que se mencionan en la tabla 3 son interferentes, excepto las muestras de plasma con altas concentraciones de gammaglobulina (>30 g/litro), que pueden provocar una reducción en la recuperación de ADN libre circulante.

Nota: Las pruebas se llevaron a cabo mediante aplicaciones posteriores ejemplares para evaluar la calidad de los ácidos nucleicos extraídos. Sin embargo, las distintas aplicaciones posteriores pueden tener diferentes requisitos en lo que respecta a la pureza (es decir, la ausencia de posibles sustancias interferentes), por lo tanto, también se debe establecer la identificación y el análisis de las sustancias relevantes como parte del desarrollo de las aplicaciones posteriores para cualquier flujo de trabajo en el que se incluya el QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

## Contaminación cruzada

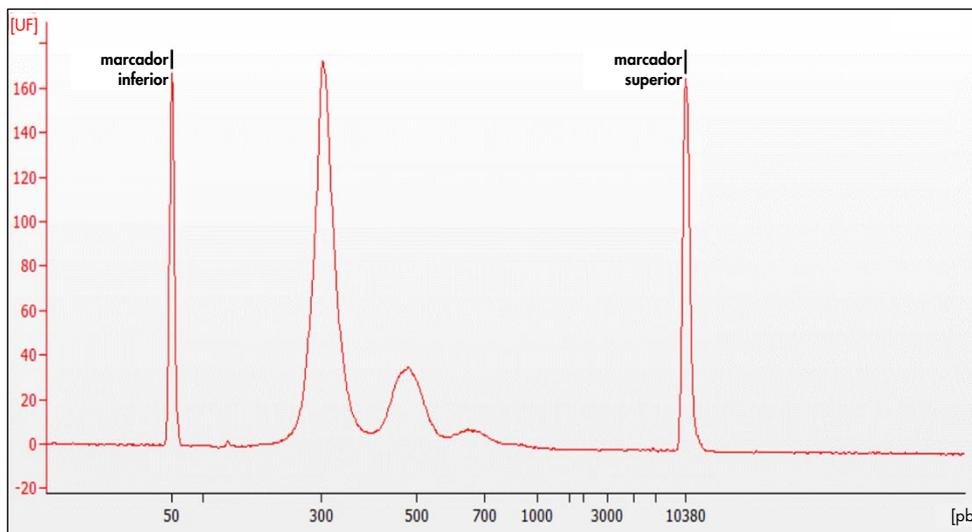
Para analizar el riesgo de contaminación cruzada del sistema QIASymphony DSP Circulating DNA se llevaron cabo tres series de 96 muestras en el instrumento QIASymphony SP con lotes en cuadrícula alternados (alternando muestras positivas y negativas). Se utilizó plasma femenino (muestra negativa) al que se añadió plasma femenino con ADNg masculino cortado de una concentración de  $1.0E+05$  copias de gen SRY1 por mililitro de plasma (muestra positiva) como materiales de muestra para un sistema modelo. La preparación de la muestra se llevó a cabo con un protocolo de 4 ml que incluye dos transferencias por separado de 2 ml de volumen cada una. La posible contaminación de las muestras de plasma femenino negativas durante las series de extracción se evaluó a través del análisis posterior de los eluidos mediante real-time PCR para el gen específico del cromosoma Y SRY1.

No se detectó contaminación cruzada en un arrastre de muestra a muestra, lote a lote o serie a serie.

## Compatibilidad con diferentes aplicaciones posteriores

Durante el desarrollo del QIASymphony DSP Circulating DNA Kit se utilizaron aplicaciones posteriores ejemplares para demostrar que los ácidos nucleicos aislados son compatibles con una amplia variedad de diferentes tecnologías de aplicación posterior, entre las que se encuentran la Real Time-PCR (consulte la figura 1, la figura 2, la figura 3, la figura 6 y la figura 7), Qubit Fluorometer (ensayo de proteínas y ensayo de ADNbc de alta sensibilidad), genoteca (consulte la figura 8) y secuenciación de nueva generación (NGS).

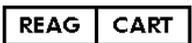
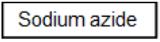
El electroferograma en la figura 8 muestra un ejemplo de una ligación de adaptadores correcta y la posterior amplificación de ccfDNA. Junto al pico prominente en 300 pb del ccfDNA nucleosómico (aprox. 165 más aprox. 70 pb por cada adaptador), también se puede ver el pico nucleosómico doble en aproximadamente 470 pb.



**Figura 8. Genoteca de ADN de ccfDNA (un solo donante) extraído con el QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.** El ccfDNA se extrajo de plasma Streck mediante el protocolo de 4 ml, y posteriormente se transfirieron 35  $\mu$ l de eluido al NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs). Tras la amplificación y la limpieza con AMPure XP, se analizó 1  $\mu$ l de eluido con el Agilent 7500 DNA Kit.

## Símbolos

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

Símbolo	Definición del símbolo
	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 (p. ej., el etiquetado de los componentes)
	Componentes
	Contenido
	Número
	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
	Advertencia/precaución
	Proteinasa K
	Número de pocillo (es decir, pocillo del cartucho de reactivos)
	Cartucho de reactivos
	Azida sódica

Símbolo

Definición del símbolo

**EtOH**

Etanol

**UDI**

Identificador único de dispositivo

## Historial de revisiones

Revisión	Descripción
R1, junio de 2022	<p>Versión 2, revisión 1</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Actualización a la versión 2 para cumplir con IVDR</li><li>• Se ha añadido la sección de sustancias interferentes, contaminación cruzada y compatibilidad con aplicaciones posteriores</li></ul>

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales de uso y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®(QIAGEN Group); Cell-Free DNA Urine Preserve®, Cell-Free DNA BCT®, Streck® (Streck); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Eppendorf®, LoBind® (Eppendorf AG); NEBNext® (New England Biolabs, Inc.); Qubit® (Thermo Fisher Scientific o sus filiales). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc., utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN. Todos los derechos reservados.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

