



Junio de 2022

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

Versión 2

IVD

Para uso diagnóstico in vitro

Para su uso con el con el QIASymphony DSP DNA Mini Kit y el QIASymphony DSP DNA Midi Kit



REF

937236, 937255



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemania

R1

Las características de rendimiento están disponibles electrónicamente y pueden encontrarse en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com.

Introducción general

Los QIAasymphony DSP DNA Kits se han diseñado para utilizarse exclusivamente en combinación con el QIAasymphony SP.

Los QIAasymphony DSP DNA Mini Kits proporcionan reactivos para la purificación automática de ADN total procedente de sangre total humana, capa leucocítica, tejidos y muestras de tejidos fijados con formalina e incorporados en parafina (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE), así como de ADN viral procedente de sangre total humana. Los QIAasymphony DSP DNA Midi Kits proporcionan reactivos para la purificación automatizada de ADN total procedente de sangre total y capa leucocítica humanas. Sin embargo, las características de rendimiento para cada tubo de recogida de sangre o tipo de tejido no se han especificado y deben ser validadas por el usuario.

La tecnología de partículas magnéticas permite la purificación de ácidos nucleicos de alta calidad que carecen de proteínas, nucleasas y otras impurezas. Los ácidos nucleicos purificados están listo para su utilización directa en aplicaciones posteriores, como las reacciones de amplificación (PCR). El QIAasymphony SP realiza todos los pasos del procedimiento de purificación. En una sola serie se procesan hasta 96 muestras, en lotes de un máximo de 24.

A continuación se muestran los datos de rendimiento seleccionados para las diferentes aplicaciones.

Características de rendimiento

Nota: Las características de rendimiento dependen en gran medida de diversos factores y se relacionan con la aplicación posterior específica. Se han establecido para los QIAasymphony DSP DNA Mini y Midi Kits en conjunto con aplicaciones posteriores ejemplares. Sin embargo, los métodos para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas se utilizan como procedimiento inicial para diversas aplicaciones posteriores. Es necesario establecer los parámetros de rendimiento como la contaminación cruzada o la precisión de ciclos para cualquier flujo de trabajo como parte del desarrollo de la aplicación posterior. Por consiguiente, es responsabilidad del usuario validar el flujo de trabajo completo para establecer los parámetros de rendimiento apropiados.

Rendimiento básico y compatibilidad con diferentes aplicaciones posteriores

ADN de sangre y capa leucocítica

Rendimiento de ADN

El rendimiento básico del QIAasymphony DSP DNA Mini Kit se analizó utilizando diferentes tubos de recogida y anticoagulantes, así como sangre total humana fresca y congelada. Se recogió sangre total de 3 donantes sanos (recuento de leucocitos [WBC] de 4,0 a 11,0 x 10⁶ células/ml) en 3 tipos de tubos diferentes: EDTA, tubo Vacutainer® de 10 ml de 16 x 100 mm de BD™ (K2-EDTA); citrato, tubo Sarstedt® S-Monovette® de 2,7 ml 9NC de 13 x 75 mm (citrato); heparina, tubo Sarstedt S-Monovette de 7,5 ml de 15 x 92 mm (heparina de litio). La sangre que se utilizó era fresca (almacenada entre 2 y 8 °C) o congelada (almacenada a -20 °C). Se purificó el ADN genómico a partir de muestras de 200 µl, con 4 duplicaciones por donante y tipo de tubo, utilizando el QIAasymphony DSP DNA Mini Kit y el protocolo DSP blood 200 con un volumen de elución de 200 µl. Los valores y la pureza del ADN se determinaron mediante un análisis espectroscópico (figura 1).

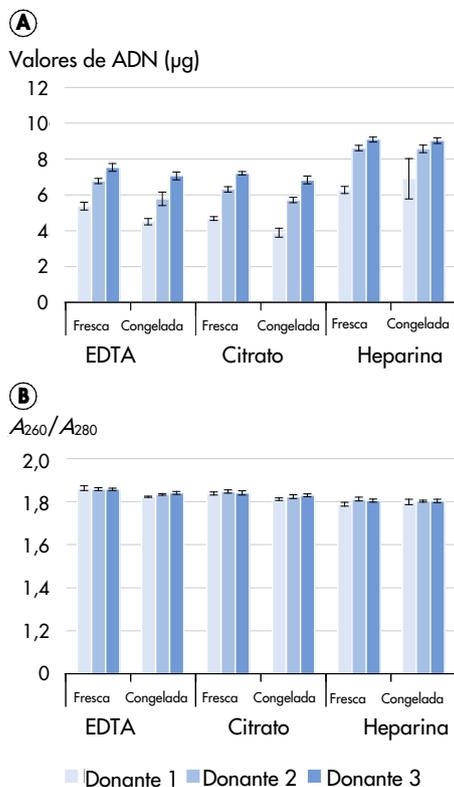


Figura 1. Rendimiento y pureza de ADN utilizando diferentes tubos de recogida de muestras y anticoagulantes con sangre total humana fresca y congelada. A Rendimiento de ADN; las barras muestran el rendimiento absoluto de ADN con la desviación estándar. **B** Pureza del ADN; las barras muestran la pureza del ADN con la desviación estándar.

Integridad del ADN

Se amplificaron productos de PCR de largo alcance (5 kb) utilizando el ensayo de PCR LongRange (figura 2).

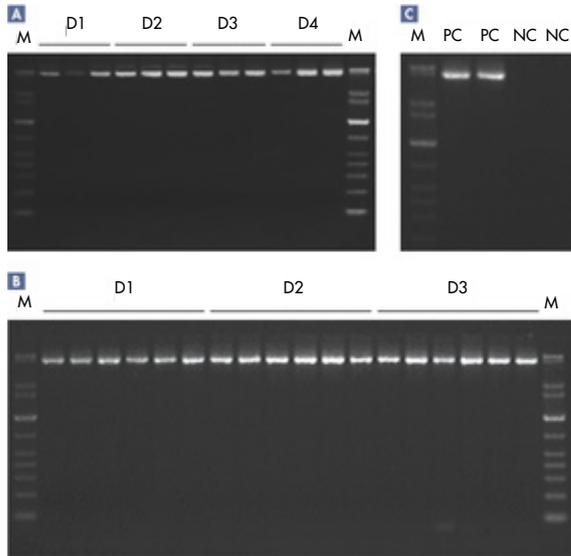


Figura 2. Integridad del ADN analizada mediante PCR de largo alcance. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** Se recogió sangre total de 4 donantes sanos (D) en tubos K2E de BD. Se purificó el ADN genómico para PCR de largo alcance a partir de alícuotas de 200 μ l por triplicado utilizando el QIAsymphony DSP DNA Mini Kit y el protocolo blood 200 DSP con un volumen de elución de 200 μ l. D1 = donante 1, D2 = donante 2, D3 = donante 3 y D4 = donante 4. **B** Se recogió sangre total de 3 donantes sanos en tubos K2E de BD y se preparó la capa leucocítica. Se purificó el ADN genómico a partir de alícuotas de 200 μ l por sextuplicado utilizando el QIAsymphony DSP DNA Mini Kit y el protocolo buffy coat 200 DSP con un volumen de elución de 200 μ l. D1 = donante 1, D2 = donante 2 y D3 = donante 3. **C** Controles: PC, control positivo y NC, control negativo.

Correlación del rendimiento de ADN con el recuento de leucocitos

Se evaluó el rendimiento de las aplicaciones QIAsymphony DSP DNA Blood y Buffy Coat utilizando muestras de sangre y capa leucocítica con 6 recuentos diferentes de leucocitos para cada tipo de muestra. Para la sangre total, los recuentos de leucocitos variaron entre 4×10^6 células/ml y $11,6 \times 10^6$ células/ml, mientras que para la capa leucocítica los recuentos variaron entre $2,2 \times 10^7$ células/ml y $5,6 \times 10^7$ células/ml. El rendimiento de ADN se determinó mediante un análisis espectroscópico y se representó gráficamente en función del recuento leucocitario (figura 3).

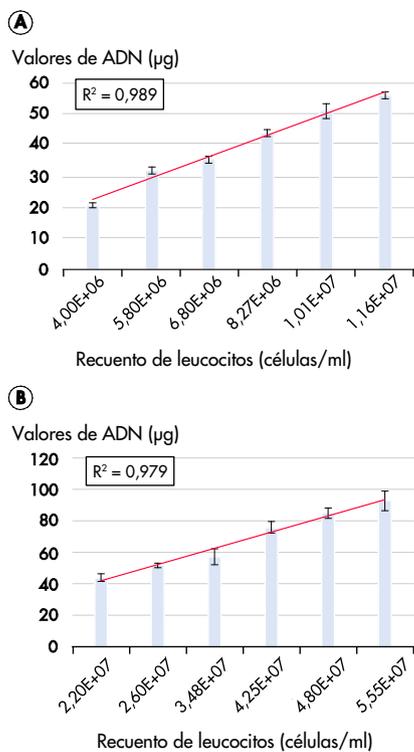


Figura 3. Correlación del rendimiento de ADN con el recuento de leucocitos. **A** Se purificó el ADN genómico a partir de 1 ml de sangre total humana utilizando el QIAAsymphony DSP DNA Midi Kit y el protocolo blood 1000 DSP con un volumen de elución de 500 µl. Las barras muestran los valores absolutos de ADN con la desviación estándar. **B** Se purificó el ADN genómico a partir de 400 µl de capa leucocítica utilizando el QIAAsymphony DSP DNA Midi Kit y el protocolo buffy coat 400 DSP con un volumen de elución de 400 µl. Las barras muestran los valores absolutos de ADN con la desviación estándar.

Sangre con virus

Se realizaron estudios de la tasa de detección diluyendo material estándar de CMV de la OMS precuantificado en sangre total humana sin CMV. Se observó una tasa de detección del 100 % para muestras con cargas virales de 90 UI de CMV por milímetro (tabla 1).

Tabla 1. Sensibilidad de la aplicación QIAAsymphony DSP Virus Blood

| CMV (UI/ml) | Duplicados | Detecciones | % de detección |
|-------------|------------|-------------|----------------|
| 350 | 18 | 18 | 100,00 |
| 230 | 32 | 32 | 100,00 |
| 115 | 31 | 31 | 100,00 |
| 90 | 32 | 32 | 100,00 |
| 60 | 30 | 24 | 80,00 |
| 30 | 30 | 15 | 50,00 |
| 15 | 30 | 10 | 33,33 |
| 6 | 21 | 5 | 23,81 |
| 2 | 21 | 2 | 9,52 |
| 0 | 15 | 0 | 0,00 |

Se recogió sangre total humana de 1 donante sano sin CMV en tubos K2E de BD y se le añadió material estándar de CMV de la OMS utilizando diferentes títulos. Se purificó el ADN viral utilizando el QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit y el protocolo DSP Virus Blood 200 con un volumen de elución de 60 µl. Se analizaron los eluidos con un ensayo de real-time PCR de CMV.

Tejido y tejido FFPE

Rendimiento de ADN

Se evaluó el rendimiento para la aplicación de tejido FFPE de QIASymphony DSP DNA mediante seis réplicas de 1 a 4 cortes FFPE de 10 µm de bazo humano recién cortado. La extracción del ADN se realizó mediante el QIASymphony DSP DNA Mini Kit en combinación con el protocolo DSP de bajo contenido tisular. La desparafinación y la lisis se realizaron con el método de pretratamiento mediante xileno/etanol. El ADN se eluyó en 50 µl de tampón de elución y el rendimiento del ADN se determinó mediante un análisis espectroscópico (figura 4).

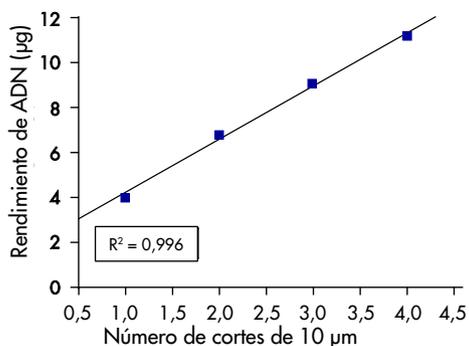


Figura 4. Correlación del rendimiento de ADN con el número de cortes de tejido FFPE. Seis duplicaciones de 1 a 4 cortes tisulares FFPE de 10 µm de bazo humano se desparafinizaron mediante un pretratamiento con xileno/etanol. La extracción del ADN se realizó con el instrumento QIASymphony SP utilizando el QIASymphony DSP DNA Mini Kit en combinación con el protocolo DSP de bajo contenido tisular y un volumen de elución de 50 µl.

Análisis del estado mutacional de los biomarcadores mediante real-time PCR

El análisis del estado mutacional de los biomarcadores se realizó utilizando ADN extraído de cortes FFPE de colon humano y ADN extraído de muestras de tejido pulmonar humano.

Para la extracción del ADN de muestras de tejido FFPE se utilizaron 3 cortes de colon humano de 10 µm para la preparación de las muestras. La extracción del ADN se realizó mediante un pretratamiento con Deparaffinization Solution y con el protocolo DSP de bajo contenido tisular en combinación con un volumen de elución de 100 µl. Se realizó el análisis mutacional del biomarcador KRAS utilizando un ensayo de real-time PCR para la detección de KRAS de acuerdo con el manual de uso del ensayo. Los valores C_T del ensayo de control se encontraron dentro del intervalo definido y el análisis de detección de mutaciones reveló una sustitución de un aminoácido en el codón 12 demostrado por un valor ΔC_T de 4,17, lo que se encuentra por debajo del valor definido de corte de 8 de una mutación 12SER (tabla 2).

Tabla 2. Resultados del análisis mutacional del biomarcador KRAS en tejido FFPE

| Muestra | Reacción | C _t diana | C _t de control interno | ΔC _t * |
|----------------------------|----------|----------------------|-----------------------------------|-------------------|
| Control sin molde | Control | 0,00 | 32,75 | - |
| | 12ALA | 0,00 | 32,65 | - |
| | 12ASP | 0,00 | 32,69 | - |
| | 12ARG | 0,00 | 32,86 | - |
| | 12CYS | 0,00 | 32,35 | - |
| | 12SER | 0,00 | 32,76 | - |
| | 12VAL | 0,00 | 32,41 | - |
| | 13ASP | 0,00 | 32,26 | - |
| Estándar | Control | 25,95 | 32,73 | - |
| | 12ALA | 26,39 | 32,29 | 0,44 |
| | 12ASP | 26,54 | 32,15 | 0,59 |
| | 12ARG | 26,35 | 32,14 | 0,40 |
| | 12CYS | 26,31 | 32,47 | 0,36 |
| | 12SER | 26,50 | 32,34 | 0,55 |
| | 12VAL | 25,80 | 31,92 | -0,15 |
| | 13ASP | 27,09 | 32,54 | 1,14 |
| Tejido FFPE (colon humano) | Control | 24,94 | 31,98 | - |
| | 12ALA | n.d. | 32,42 | - |
| | 12ASP | n.d. | 32,73 | - |
| | 12ARG | n.d. | 33,05 | - |
| | 12CYS | n.d. | 32,74 | - |
| | 12SER | 29,11 | 32,34 | 4,17 |
| | 12VAL | n.d. | 32,81 | - |
| | 13ASP | n.d. | 33,20 | - |

* $\Delta C_t = M C_t - C C_t$, donde M significa mutación, C significa control y n.d. no detectado.

Para la extracción del ADN a partir de muestras de tejidos congelados se utilizaron 25 mg de pulmón humano para la preparación de la muestra con el protocolo DSP de alto contenido tisular y un volumen de elución de 200 μ l. Se realizó el análisis mutacional del biomarcador EGFR utilizando un ensayo de real-time PCR para EGFR. Se realizaron un análisis de control y una detección de la mutación tal y como se describe en el manual de uso del ensayo. Los resultados revelaron una delección dentro del gen EGFR, tal como demuestra el valor ΔC_t de 2,47, que es inferior al valor de corte establecido de 12 para la detección de una mutación (tabla 3).

Tabla 3. Resultados del análisis mutacional del biomarcador EGFR en tejido congelado

| Muestra | Reacción | C _T diana | C _T de control interno | ΔC _T * |
|------------------------|------------|----------------------|-----------------------------------|-------------------|
| Control sin molde | Control | 0,00 | 31,71 | - |
| | T790M | 0,00 | 32,36 | - |
| | Deleciones | 0,00 | 31,75 | - |
| | L858R | 0,00 | 32,05 | - |
| | L861Q | 0,00 | 31,77 | - |
| | G719X | 0,00 | 31,68 | - |
| | S768I | 0,00 | 32,25 | - |
| | Ins | 0,00 | 31,84 | - |
| Estándar | Control | 28,78 | 31,05 | - |
| | T790M | 30,08 | 31,13 | 1,30 |
| | Deleciones | 28,23 | 31,19 | -0,55 |
| | L858R | 27,58 | 30,83 | -1,20 |
| | L861Q | 27,80 | 30,86 | -0,98 |
| | G719X | 27,80 | 30,90 | -0,98 |
| | S768I | 29,28 | 31,41 | 0,50 |
| | Ins | 28,00 | 31,64 | -0,78 |
| Tejido (pulmón humano) | Control | 25,76 | 31,23 | - |
| | T790M | n.d. | 31,99 | - |
| | Deleciones | 28,23 | 30,99 | 2,47 |
| | L858R | n.d. | 31,33 | - |
| | L861Q | n.d. | 31,98 | - |
| | G719X | n.d. | 32,06 | - |
| | S768I | n.d. | 31,88 | - |
| | Ins | n.d. | 31,62 | - |

* $\Delta C_T = M C_T - C C_T$, donde M significa mutación, C significa control y n.d. no detectado.

Repetibilidad y reproducibilidad

ADN de sangre

La extracción del ADN se realizó con el protocolo DSP blood 200 con un volumen de elución de 200 μ l. La repetibilidad fue evaluada por un único operador que realizó tres series independientes (cada una de 96 muestras) en tres días diferentes, con cada serie compuesta por 4 lotes de 24 muestras (tabla 4 y tabla 5).

La reproducibilidad fue evaluada mediante 3 ciclos independientes (cada uno de 96 muestras) en tres días diferentes realizados por 3 operadores diferentes en diferentes instrumentos QIASymphony SP, con cada ciclo compuesto por 4 lotes de 24 muestras (tabla 6 y tabla 7).

Tabla 4. Resultados del análisis de repetibilidad

| Serie | Lote | n | Valor medio de ADN (µg) | DE | CV |
|-------|------|-----|-------------------------|------|------|
| 1 | 1 | 24 | 5,32 | 0,22 | 4,22 |
| | 2 | 24 | 4,90 | 0,22 | 4,54 |
| | 3 | 24 | 4,95 | 0,21 | 4,26 |
| | 4 | 24 | 5,05 | 0,18 | 3,60 |
| 2 | 1 | 24 | 5,17 | 0,30 | 5,84 |
| | 2 | 24 | 4,90 | 0,15 | 3,14 |
| | 3 | 24 | 4,82 | 0,20 | 4,13 |
| | 4 | 24 | 4,87 | 0,17 | 3,52 |
| 3 | 1 | 24 | 5,11 | 0,17 | 3,33 |
| | 2 | 24 | 4,84 | 0,24 | 4,91 |
| | 3 | 24 | 4,87 | 0,16 | 3,38 |
| | 4 | 24 | 4,78 | 0,16 | 3,38 |
| Total | - | 288 | 4,96 | - | - |

n, número de réplicas; DE, desviación estándar y CV, coeficiente de variación.

Tabla 5. Datos de precisión para el análisis de repetibilidad

| | DE | CV |
|--------------------------------|------|------|
| Entre lotes en la misma serie | 0,25 | 4,95 |
| Exactitud de repetición global | 0,26 | 5,18 |

SD, desviación estándar y CV, coeficiente de variación.

Tabla 6. Resultados del análisis de reproducibilidad

| Serie | Lote | n | Valor medio de ADN (µg) | DE | CV |
|-------|------|-----|-------------------------|------|------|
| 1 | 1 | 24 | 5,32 | 0,22 | 4,22 |
| | 2 | 24 | 4,90 | 0,22 | 4,54 |
| | 3 | 24 | 4,95 | 0,21 | 4,26 |
| | 4 | 24 | 5,05 | 0,18 | 3,60 |
| 2 | 1 | 24 | 5,73 | 0,22 | 3,81 |
| | 2 | 24 | 5,56 | 0,26 | 4,63 |
| | 3 | 24 | 5,40 | 0,20 | 3,63 |
| | 4 | 24 | 5,46 | 0,21 | 3,89 |
| 3 | 1 | 24 | 5,73 | 0,26 | 4,62 |
| | 2 | 24 | 5,54 | 0,24 | 4,40 |
| | 3 | 24 | 5,41 | 0,18 | 3,34 |
| | 4 | 24 | 5,49 | 0,17 | 3,16 |
| Total | - | 288 | 5,38 | - | - |

n, número de réplicas; DE, desviación estándar y CV, coeficiente de variación.

Tabla 7. Datos de precisión para el análisis de reproducibilidad

| | DE | CV |
|--------------------------------|------|------|
| Entre lotes en la misma serie | 0,25 | 4,73 |
| Exactitud de repetición global | 0,38 | 7,03 |

SD, desviación estándar y CV, coeficiente de variación.

Rendimiento comparativo

ADN de sangre

Se analizó el rendimiento del sistema QIAasymphony DSP DNA Blood en comparación con el sistema EZ1® DSP DNA Blood y el procedimiento de preparación manual del QIAamp® DNA Blood Mini Kit. El ADN se purificó a partir de diferentes muestras de sangre, se analizó para determinar el rendimiento del ADN (figura 5).

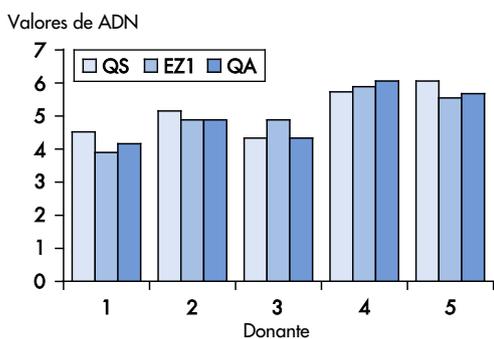


Figura 5. Comparación del rendimiento de ADN entre diferentes sistemas de purificación de ADN procedente de sangre. Se recogió sangre total de 5 donantes sanos en tubos K2E de BD. Para todos los métodos, se utilizaron volúmenes de entrada de muestras de 200 µl y volúmenes de elución de 200 µl. QS, QIAasymphony DSP DNA Mini Kit y protocolo blood 200 DSP; EZ1, EZ1 Advanced XL con el EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA, QIAamp DNA Blood Mini Kit. Las barras muestran el rendimiento de ADN para cada muestra.

Tejido y tejido FFPE

El rendimiento del QIAasymphony DSP DNA Mini Kit se comparó con el rendimiento del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit manual y el QIAamp DSP DNA Mini Kit utilizando como material de muestra respectivamente tejido FFPE y tejido fresco y congelado. Se realizaron simultáneamente preparaciones manuales y automatizadas de las muestras, así como una cuantificación de los valores del ADN. El rendimiento de ADN tras la extracción de muestras de tejidos frescos/congelados y de tejido FFPE utilizando el QIAasymphony DSP DNA Mini Kit, el QIAamp DSP DNA Mini Kit (tejido) y el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (tejido FFPE) se muestra en la figura 6.

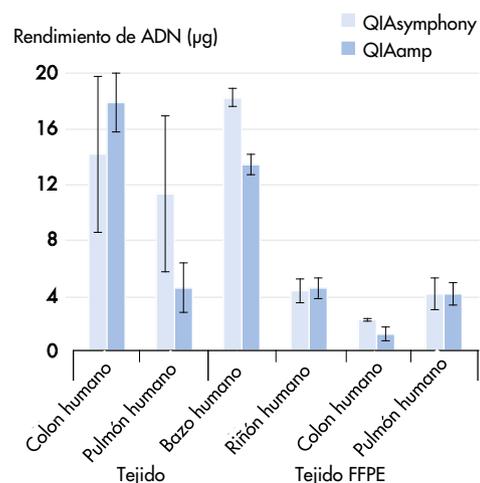


Figura 6. Extracción de ADN del tejido y de muestras de tejido FFPE. En el caso de tejido fresco/congelado, las muestras de pulmón y colon humanos se cortaron en seis piezas de 25 mg. Se utilizaron tres piezas de cada tipo de tejido para la preparación de muestras con el instrumento QIAasymphony SP en combinación con el protocolo DSP de alto contenido tisular. La extracción del ADN de las muestras restantes se realizó con el QIAamp DSP DNA Mini Kit. El ADN se eluyó en 200 µl y se determinó el rendimiento del ADN por un análisis espectroscópico. Para la extracción del ADN del tejido FFPE se prepararon 12 replicas con 3 cortes de tejidos FFPE de 10 µm procedentes de distintos órganos humanos. Se utilizaron seis muestras para la preparación de muestras con el instrumento QIAasymphony SP en combinación con un pretratamiento con Deparaffinization Solution y el protocolo DSP de bajo contenido tisular. La extracción del ADN de las muestras restantes se realizó con el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. El ADN se eluyó en 50 µl y se determinó el rendimiento del ADN por un análisis espectroscópico. Las barras muestran los valores absolutos de ADN con la desviación estándar.

Rango de introducción de muestra/extracción de eluido

ADN de sangre

Se compararon los diferentes rangos de introducción de muestra y extracción de eluido para la aplicación de ADN de sangre utilizando muestras de donantes de sangre con un rango de recuento de leucocitos desde 5,0 hasta 8,0 x 10⁶ células/ml.

Se recogió sangre total de 8 donantes sanos en tubos K2E de BD. Se purificó el ADN a partir de 6 réplicas, utilizándose en cada una de ellas los QIASymphony DSP DNA Mini/Midi Kits y el protocolo DNA blood 200 DSP con 200 µl de volumen de elución, el protocolo DNA blood 400 DSP con 400 µl de volumen de elución y el protocolo DNA blood 1000 DSP con 500 µl de volumen de elución (figura 7).

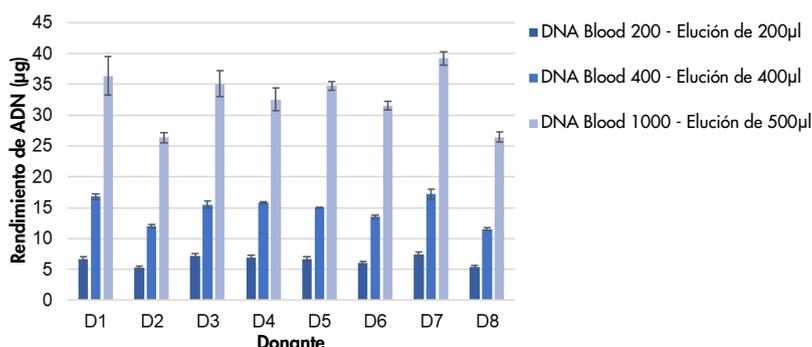


Figura 7. Comparación de diferentes introducciones de muestra y volúmenes de elución para los sistemas de purificación del ADN de la sangre. Se recogió sangre total de 8 donantes sanos en tubos K2E de BD. Se realizó una extracción de ADN utilizando el protocolo DNA blood 200 con 200 µl de volumen de elución, el protocolo DNA blood 400 con 400 µl de volumen de elución y el protocolo DNA blood 1000 con 500 µl de volumen de elución. Se determinó el rendimiento del ADN por análisis espectroscópico. Las barras muestran el rendimiento de ADN absoluto (valor de media con desviación estándar) para cada donante.

Sangre con virus

Se recogió sangre total de 3 donantes sanos, con un rango de recuento de leucocitos desde 4,0 hasta 11,0 x 10⁶ células/ml, en tubos K2E de BD y se añadió material estándar de CMV (título de 3,7 log copias/ml). Se purificó el ADN viral a partir de 7 duplicaciones, utilizándose en cada una de ellas el QIASymphony DSP DNA Mini Kit y el protocolo virus blood 200 DSP con 4 volúmenes de elución diferentes (figura 8).

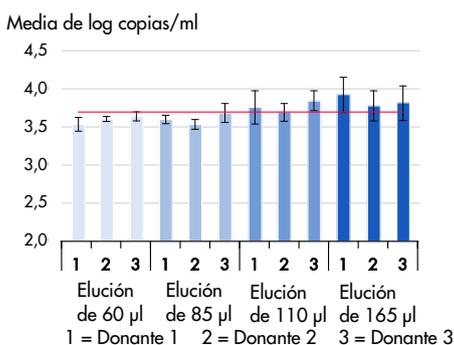


Figura 8. Comparación de la cuantificación de ADN viral para diferentes volúmenes de elución. Los eluidos procedentes de cada muestra de donante y volumen de elución (60 µl, 85 µl, 110 µl y 165 µl) se analizaron con un ensayo de real-time PCR de CMV. La línea roja representa el título deseado y las barras muestran la media de los valores logarítmicos de copias por milímetro con la desviación típica.

Estabilidad del eluido

Nota: La estabilidad del eluido depende en gran medida de diversos factores y se relaciona con la aplicación posterior específica. Se ha establecido para los QIASymphony DSP Mini y Midi Kits junto con aplicaciones posteriores ejemplares. Es responsabilidad del usuario consultar las instrucciones de uso para la aplicación posterior específica utilizada en su laboratorio y/o validar el flujo de trabajo completo para establecer las condiciones de almacenamiento apropiadas.

ADN de sangre y capa leucocítica

Se analizó la estabilidad para la aplicación de ADN de sangre utilizando eluidos de series QS realizados con el protocolo DNA Blood 200 con 200 µl de volumen de elución y con el protocolo DNA Blood 1000 con 500 µl de volumen de elución. Se almacenaron los eluidos en tubos Sarstedt de 2 ml a temperatura ambiente, entre 2 y 8 °C o entre -20 °C y -80 °C. Se determinó la pureza y el rendimiento del ADN mediante un análisis espectroscópico. Se analizó la integridad del ADN mediante una electroforesis en gel y un ensayo de PCR LongRange (figura 9).

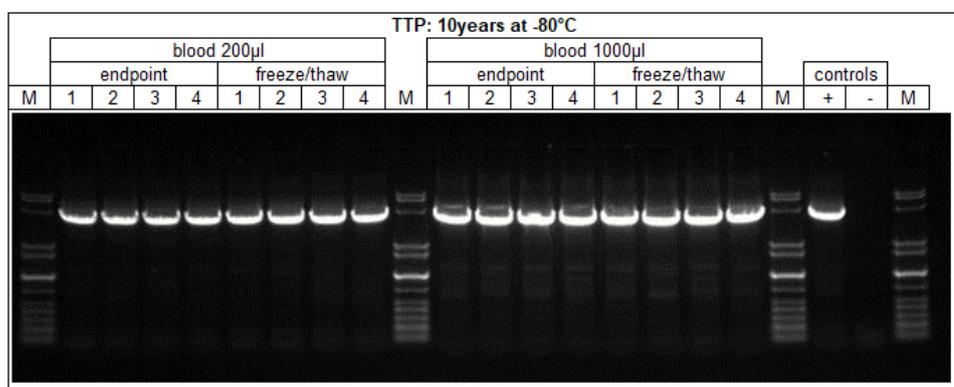


Figura 9. Estabilidad del eluido para el ADN de sangre. Se purificó el ADN utilizando los protocolos DNA Blood 200 µl y 1000 µl. Los eluidos se han almacenado en tubos Sarstedt de 2 ml a -80 °C. Se analizaron cuatro réplicas. Se analizó la integridad del ADN mediante PCR de largo alcance. Las figuras muestran los resultados tras un almacenamiento de 10 años. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

Se analizó la estabilidad del eluido para la aplicación de capa leucocítica a partir de series de QS realizadas con el protocolo BC 400 µl y un volumen de elución de 200 µl. Se almacenaron los eluidos en tubos Sarstedt de 2 ml y en gradillas de microtubos de elución a temperatura ambiente, entre 2 y 8 °C o entre -20 °C y -80 °C. Además, los eluidos se sometieron a pruebas de congelación/descongelación de hasta 3 ciclos (figura 10). Se determinaron la pureza y el rendimiento del ADN por análisis espectroscópico. Se analizó la integridad del ADN mediante una electroforesis en gel y un ensayo de PCR LongRange (50 µl por reacción).

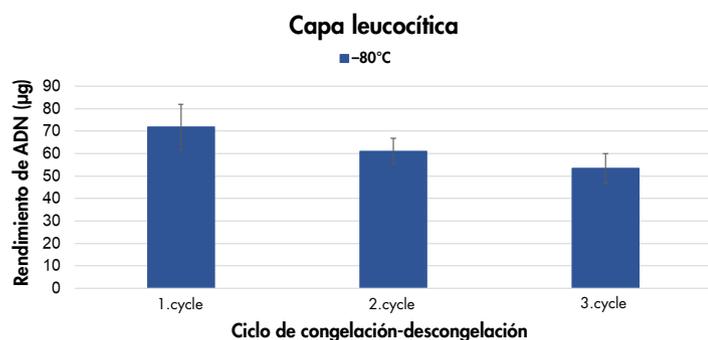


Figura 10. Ciclos de congelación/descongelación de eluidos para la capa de leucocitos. Se purificó el ADN utilizando el protocolo DNA BC 400 µl. Se generó una capa leucocítica a partir de sangre con EDTA. Los eluidos se han almacenado en tubos Sarstedt de 2 ml. Se determinó el rendimiento de ADN en 3 puntos temporales de análisis utilizando el mismo eluido con 3 ciclos de congelación y descongelación. Se determinó el rendimiento del ADN por análisis espectroscópico. Las barras muestran el rendimiento de ADN absoluto (valor de media con desviación estándar).

Sangre con virus

Se analizó la estabilidad para la aplicación de sangre vírica utilizando eluidos de series QS realizados con el protocolo Virus Blood 200 con 60 µl de volumen de elución. Se utilizó como material de muestra sangre con EDTA K₂ añadida a un CMV estándar comercial (título 2,7 log copias/ml). Se almacenaron los eluidos en tubos Sarstedt de 2 ml entre 2 y 8 °C o entre -20 °C y -80 °C. Los eluidos se analizaron utilizando un ensayo en tiempo real de CMV (figura 11). A continuación se muestran los resultados de diversos puntos temporales del análisis.

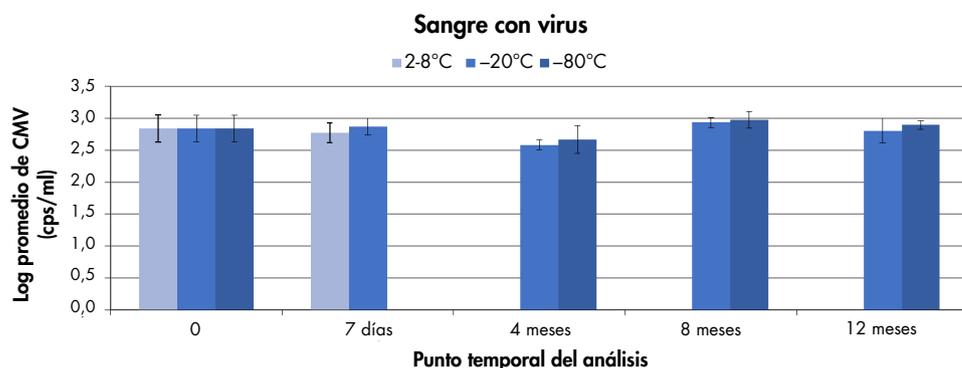


Figura 11. Estabilidad del eluido para aplicación de sangre vírica. Se purificaron las muestras de sangre con EDTA con estándar de CMV comercial añadido con el protocolo Virus Blood 200. Los eluidos se han almacenado a diferentes temperaturas en gradillas de microtubos de elución y en tubos Sarstedt de 2 ml. Por cada punto temporal de análisis, se analizaron 4 réplicas. Las barras muestran el título de CMV (valor medio de log con desviación estándar).

Tejido

Se analizó la estabilidad del eluido para la aplicación tisular utilizando el protocolo Tissue HC 200 µl y con 200 µl de volumen de elución. Se utilizó hígado bovino fresco como material de muestra. Se almacenaron los eluidos en tubos Sarstedt de 2 ml y en gradillas de microtubos de elución a temperatura ambiente, entre 2 y 8 °C o entre -20 °C y -80 °C. Se determinó la pureza y el rendimiento del ADN mediante un análisis espectroscópico (figura 12). Se analizó la integridad del ADN mediante una electroforesis en gel.

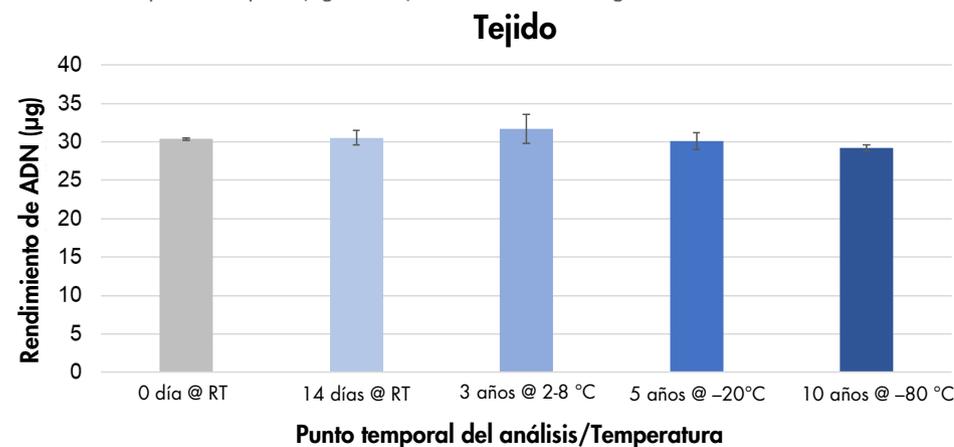
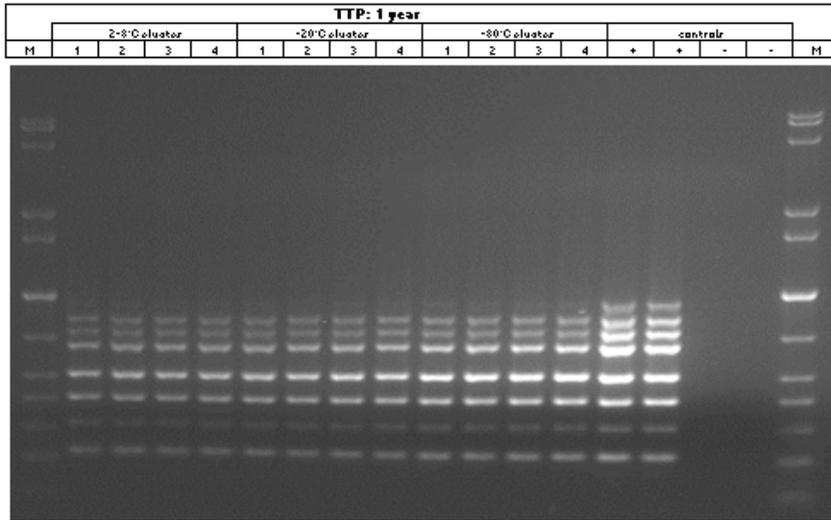


Figura 12. Estabilidad del eluido para tejido. Se purificó el ADN utilizando el protocolo DNA Tissue HC con 200 µl de volumen de elución. Se utilizó hígado bovino fresco como material de muestra. Los eluidos se han almacenado a diferentes temperaturas en gradillas de microtubos de elución y en tubos Sarstedt de 2 ml. Por cada punto temporal de análisis, se analizaron 4 réplicas. Se determinó el rendimiento del ADN por análisis espectroscópico. Las barras muestran el rendimiento de ADN absoluto (valor de media con desviación estándar).

Tejido FFPE

Se analizó la estabilidad del eluido para la aplicación tisular FFPE utilizando el protocolo Tissue LC 200 µl y con 100 µl de volumen de elución. Se utilizó tejido FFPE humano comercial como material de muestra. Se almacenaron los eluidos en tubos Sarstedt de 2 ml y en gradillas de microtubos de elución a temperatura ambiente, entre 2 y 8 °C o entre -20 °C y -80 °C. Los eluidos se analizaron en un ensayo de PCR interno de 8 pares en humanos (figura 13). A continuación se muestran los resultados de dos puntos temporales del análisis.

A:



B:

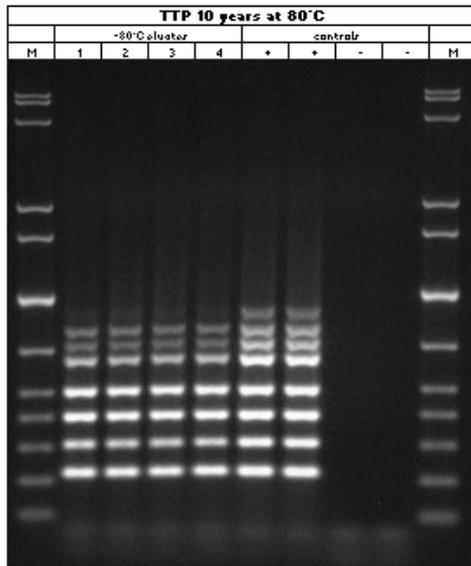


Figura 13. Estabilidad del eluido para tejido FFPE. Se purificó el ADN utilizando el protocolo DNA Tissue LC. Se utilizó tejido FFPE comercial como material de muestra. Los eluidos se han almacenado a diferentes temperaturas en gradillas de microtubos de elución y en tubos Sarstedt de 2 ml. Por cada punto temporal de análisis, se analizaron 4 réplicas. Se analizaron los eluidos en un ensayo de PCR interno de 8 pares en humanos.

Sustancias interferentes

Se probó la influencia de las sustancias inhibidoras, que pueden estar presentes en la sangre total, en el rendimiento de la aplicación de ADN en sangre, la aplicación de virus en sangre y la aplicación de tejidos mediante la adición de las siguientes sustancias:

Tabla 8. Se han probado las posibles sustancias interferentes para las diferentes aplicaciones

| Sustancias interferentes | Concentración | Sangre | Sangre con virus | Tejido |
|--------------------------|---------------|--------|------------------|--------|
| Bilirrubina | 200 mg/l | √ | √ | √ |
| Hemoglobina | 200 g/l | √ | √ | |
| Triglicéridos | 30 g/l | √ | √ | √ |
| Proteína | 120 g/l | √ | √ | √ |

Nota: «√» indica qué materiales de muestra se analizaron para la posible sustancia interferente respectiva.

Para la hemoglobina (200 g/l) y las proteínas (120 g/l), se determinaron los niveles existentes en la muestra de sangre y se añadieron hemoglobina o proteínas para alcanzar las concentraciones indicadas, 200 g/l o 120 g/l, respectivamente. Para la bilirrubina (200 mg/l) y los triglicéridos (30 g/l), se añadió la cantidad total de cada sustancia a las muestras para alcanzar las concentraciones indicadas.

Para el tejido, la cantidad total de cada sustancia se añadió directamente a los lisados; no se realizó ninguna determinación para la bilirrubina, triglicéridos o concentración de proteína de la muestra de tejido utilizada.

Cualquier posible sustancia interferente (p. ej., medicinas) y la concentración correspondiente es muy específica a la aplicación posterior y a los posibles tratamientos médicos previos de un paciente y es necesaria una investigación durante la verificación de dicha aplicación posterior utilizando los QIASymphony DSP DNA Mini y Midi Kits.

Nota: Se realizó la prueba utilizando aplicaciones posteriores ejemplares para una evaluación de la calidad de los ácidos nucleicos extraídos. Sin embargo, las diferentes aplicaciones posteriores podrían tener diferentes necesidades con respecto a la pureza (p. ej., ausencia o concentración de posibles sustancias interferentes), por lo que es necesario establecer la identificación y las pruebas de sustancias relevantes y las respectivas concentraciones como parte del desarrollo de aplicaciones posteriores para cualquier flujo de trabajo que involucren los QIASymphony DSP Mini y Midi Kits.

Nota: Tenga en cuenta que durante el desarrollo del QIASymphony DSP DNA Midi Kit no se han observado indicaciones de que la heparina tenga un impacto negativo en el rendimiento. Sin embargo, la norma ISO 20186-2:2019(E) establece que la heparina de los tubos de recogida puede tener impacto en la pureza de los ácidos nucleicos aislados y el posible arrastre a los eluidos podría causar inhibiciones en algunas aplicaciones posteriores. Por consiguiente, es responsabilidad del usuario validar si la heparina tiene una influencia negativa en su flujo de trabajo.

ADN de sangre y capa leucocítica

Para las aplicaciones de ADN de sangre, se realizó una prueba utilizando el protocolo DSP DNA 1000, que cubre el mayor volumen de introducción de muestra, utilizando 200 y 500 µl de volumen de elución.

Se analizaron los eluidos por análisis espectroscópico para el rendimiento y pureza del ADN. Se analizó la compatibilidad de PCR utilizando una real-time PCR además de un ensayo de PCR de punto final.

Ninguna de las sustancias enumeradas en la tabla 9 son interferentes; sin embargo, las muestras de sangre con altas concentraciones de triglicéridos (>30 g/l) pueden reducir el rendimiento del ADNg.

Sangre con virus

Para la aplicación de sangre vírica, se realizó una prueba utilizando el protocolo DSP Virus Blood 200, utilizando 60 µl de volumen de elución. Se añadieron 500 copias/ml (baja concentración) y 1×10^4 copias/ml (alta concentración, figura 14) de un CMV estándar comercial a las muestras de sangre negativas a CMV.

Se analizaron los eluidos con un ensayo de real-time PCR de CMV.

Ninguna de las sustancias enumeradas en la tabla 9 son interferentes; sin embargo, las muestras de sangre con altas concentraciones de triglicéridos (>30 g/l) pueden reducir la purificación de ADN vírico.

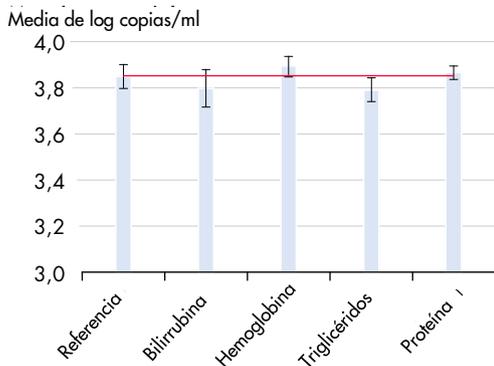


Figura 14. Prueba de sustancia inhibidora. Se recogió sangre total de 1 donante sano en tubos K2E de BD y se le añadió material estándar de CMV (título de 4,0 log copias/ml). Se analizaron 5 muestras mediante la adición de posibles inhibidores y se purificó el ADN viral a partir de 4 réplicas de cada muestra utilizando el QIASymphony DSP DNA Mini Kit y el protocolo virus blood 200 DSP con un volumen de elución de 165 µl. Se analizaron los eluidos con un ensayo de real-time PCR de CMV. La línea roja representa el título determinado para las muestras de referencia, a las que no se añadió ninguna sustancia inhibidora, y las barras muestran la media del valor logarítmico de copias por mililitro con la desviación estándar.

Tejido

Para el tejido de ADN (fresco y congelado), se realizaron pruebas utilizando el protocolo DSP DNA HC, utilizando 200 µl de volumen de elución.

Se analizaron los eluidos por análisis espectroscópico para el rendimiento y pureza del ADN. Se probó la compatibilidad de PCR utilizando un ensayo de real-time PCR.

No se ha identificado que ninguna de las sustancias enumeradas en la tabla 9 tuviera un impacto negativo en la preparación de muestras.

Tejido FFPE

Para el tejido FFPE, se realizó una prueba con el protocolo DSP DNA LC, utilizando 50 µl de volumen de elución.

Se añadieron las sustancias directamente al lisado (consulte la tabla 9).

Tabla 9. Se han probado las posibles sustancias interferentes para las diferentes aplicaciones

| Sustancias interferentes | Concentración en lisado |
|----------------------------|-------------------------|
| Xileno | Hasta el 11 % |
| Etanol | Hasta el 11 % |
| Deparaffinization Solution | Hasta el 11 % |
| Parafina | Sección de 0,1 µM |

Se analizaron los eluidos por análisis espectroscópico para el rendimiento y pureza del ADN. Se analizó la compatibilidad de PCR utilizando una real-time PCR además de un ensayo de PCR interno de 8 pares en humanos.

No se ha identificado que ninguna de las sustancias enumeradas en la tabla 9 tuviera un impacto negativo en la preparación de muestras.

Contaminación cruzada

ADN de sangre

Se analizó el riesgo de contaminación cruzada de la aplicación QIASymphony DNA Blood realizando cuatro ciclos de 96 muestras en el instrumento QIASymphony SP con lotes en cuadrícula (alternando muestras negativas y positivas), interrumpido por lotes completamente negativos. Se utilizó como sistema modelo sangre masculina (que contiene un recuento de leucocitos de $\geq 1,0 \times 10^7$ células/ml) y sangre femenina que contiene un recuento de leucocitos entre $4,0 \times 10^6$ y 9×10^6 células/ml). Se realizó la preparación de las muestras utilizando el protocolo de sangre de 1000 µl, que conforma el mayor volumen de muestra. Se evaluó una contaminación potencial de las muestras femeninas negativas durante las series de extracción por un análisis posterior de los eluidos utilizando una real-time PCR para el cromosoma Y.

No se detectó contaminación cruzada entre muestras, entre lotes o entre series.

Símbolos

Los siguientes símbolos aparecen en este documento. Para obtener una lista completa de los símbolos utilizados en las instrucciones de uso o en el embalaje y etiquetado, consulte el manual de uso.

| Símbolo | Definición del símbolo |
|---|--|
|  | 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 |
| Rn | "R" es la revisión de las Instrucciones de uso y "n" es el número de revisión |
|  | Fabricante |

Historial de revisiones

| Revisión | Descripción |
|-------------------|--|
| R1, junio de 2022 | <p>Versión 2, Revisión 1</p> <ul style="list-style-type: none">• Actualización a la versión 2 para cumplir con el IVDR• Se han añadido secciones de Sustancias interferentes, Contaminación cruzada, Estabilidad del eluido y Compatibilidad con aplicaciones posteriores |

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 o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

