

Febrero 2017

Kit QIAasymphony[®] DSP Circulating DNA

Características del rendimiento

IVD

CE

MAT

937556

Contenido

Características del rendimiento	4
Rendimiento básico	4
Precisión de la serie.....	6
Rendimiento equivalente de los protocolos de 2 ml y 4 ml.....	7
Distribución del tamaño	8
Estabilidad del eluido	10

El sistema QIAAsymphony DSP Circulating DNA constituye un sistema *in vitro* listo para usar para la purificación cualitativa de ADN circulante libre (ccfDNA) humano procedente de plasma humano y orina.

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

El kit QIAAsymphony DSP Circulating DNA proporciona reactivos para la purificación totalmente automatizada y simultánea de ccfDNA humano procedente de una amplia gama de tipos de plasma humano (anticoagulado con EDTA o citrato, así como de tubos de recogida de sangre estabilizadores de ccfDNA) y de orina humana (estabilizada y no estabilizada). La característica de rendimiento para cada tubo de recogida de sangre no se ha especificado y debe ser validada por el usuario.

El ccfDNA es compatible con una amplia gama de aplicaciones subsiguientes. El instrumento QIAAsymphony 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.

Características del rendimiento

Rendimiento básico

El rendimiento básico del kit QIAasymphony DSP Circulating DNA se evaluó utilizando 48 donantes individuales para ccfDNA extraído de 4 ml de plasma estabilizado, de 4 ml de plasma con EDTA y de 4 ml de orina estabilizada. La cantidad de ccfDNA se determinó con un ensayo interno de PCR en tiempo real 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 estabilizado), figura 2 (4 ml de plasma con EDTA) y la figura 3 (4 ml de orina estabilizada) 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. Las diferentes cantidades de ccfDNA entre el plasma estabilizado y con EDTA muestran una estrecha correlación para los 48 donantes individuales si se utiliza plasma de dos tipos diferentes de tubos de recogida de sangre (*Blood Collection Tube*, BCT) (figura 1 y figura 2).

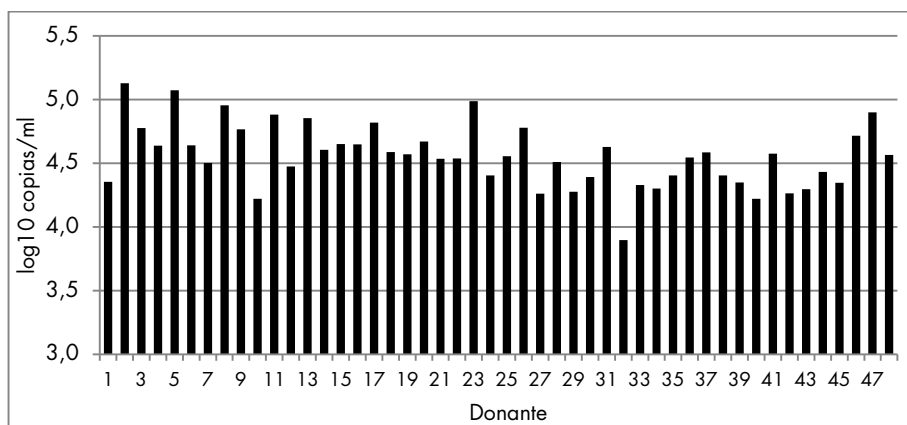


Figura 1. Cantidad de ccfDNA a partir de plasma procedente de 48 donantes individuales: tubos de recogida de sangre estabilizadores de ccfDNA. La sangre de 48 donantes individuales se recogió en tubos de recogida de sangre estabilizadores de ccfDNA. El ccfDNA se extrajo a partir de 4 ml de plasma mediante el kit QIAAsymphony DSP Circulating DNA y se cuantificó mediante un ensayo interno de PCR en tiempo real para la secuencia de codificación 18S. Los resultados se calcularon como copias objetivo por ml de plasma introducido.

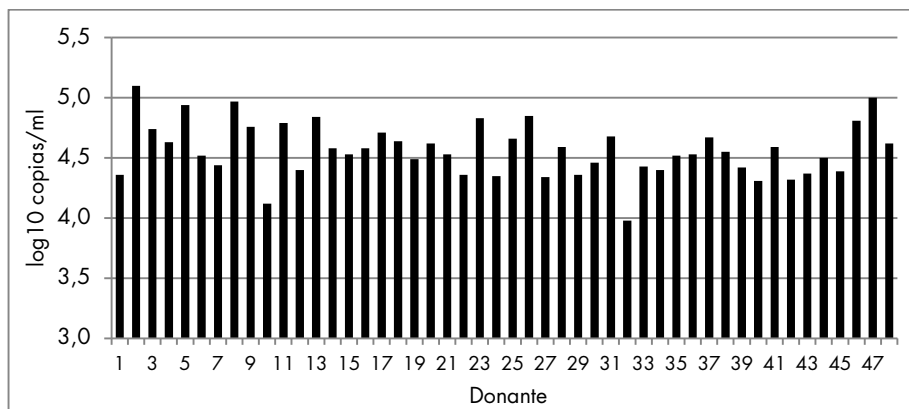


Figura 2. Cantidad de ccfDNA a partir de plasma procedente de 48 donantes individuales: Tubos de recogida de sangre con EDTA. La sangre de 48 donantes individuales se recogió en tubos de recogida de sangre con EDTA. El ccfDNA se extrajo a partir de 4 ml de plasma mediante el kit QIAAsymphony DSP Circulating DNA y se cuantificó mediante un ensayo interno de PCR en tiempo real para la secuencia de codificación 18S. Los resultados se calcularon como copias objetivo por ml de plasma introducido.

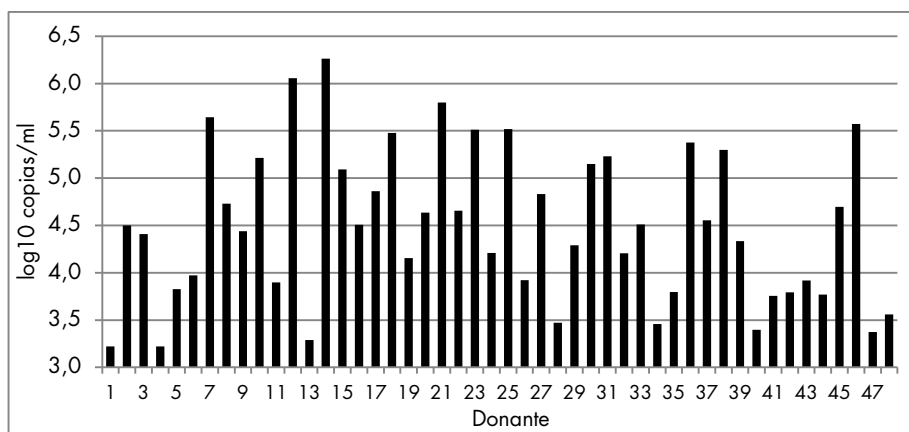


Figura 3. Cantidad de ccfDNA a partir de orina estabilizada procedente de 48 donantes. La orina de 48 donantes individuales se estabilizó inmediatamente después de la recolección. El ccfDNA se extrajo a partir de 4 ml de orina mediante el kit QIASymphony DSP Circulating DNA y se cuantificó mediante un ensayo interno de PCR en tiempo real para la secuencia de codificación 18S. Los resultados se calcularon como copias objetivo por ml de orina introducida.

Precisión de la serie

Se determinaron los coeficientes de variación (CV) para la extracción de ccfDNA humano a partir de plasma con EDTA. Para el análisis de la precisión, el ccfDNA se cuantificó con un ensayo interno de PCR en tiempo real para la secuencia de codificación ribosómica 18S. En total, se realizaron 10 series con el instrumento QIASymphony, cada una con 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 ml y 4 ml

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

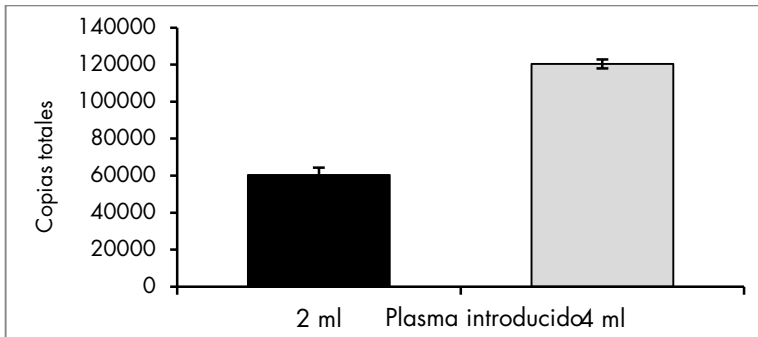


Figura 4. Rendimiento equivalente utilizando el protocolo de introducción de muestras de 2 ml y 4 ml El intervalo lineal del protocolo de ccfDNA se determinó mediante protocolos de 2 ml y 4 ml. El ccfDNA se cuantificó con un ensayo interno de PCR en tiempo real para la secuencia de codificación 18S.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

Tabla 2. Diferencia entre los protocolos de 2 ml 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

El rendimiento de los protocolos para una introducción de muestras de 2 ml y 4 ml, medido en copias calculadas/ml, 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 kit QIASymphony DSP Circulating DNA, 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 realizó un total de 5 duplicados independientes. Se muestra un perfil de ADN representativo para plasma en la figura 5 y para orina estabilizada en la figura 6.

El electroferograma para plasma en la figura 5 muestra el pico observado con frecuencia a ~160 bp, que abarca desde 145 bp a 196 bp y que corresponde al intervalo de longitud del ADN unido a histonas en el nucleosoma. El electroferograma para orina en la figura 6 muestra que el pico predominante a ~160 bp es más ancho, abarcando entre ~145 bp y 250 bp. Asimismo, para orina existe un segundo pico desde ~20 bp hasta 100 bp (a nivel del pico marcador inferior) que indica la presencia de una fracción de ccfDNA con un mayor grado de fragmentación. Además, la figura 6 muestra un número elevado de fragmentos de ADN largos a partir de ~ 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.

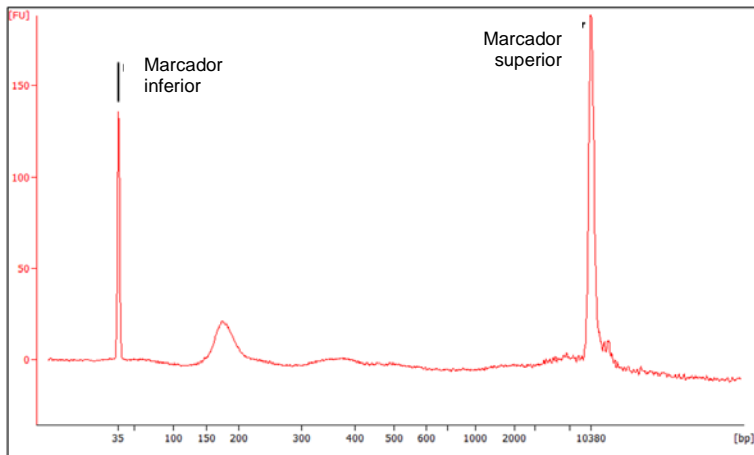


Figura 5. Distribución de tamaños de ccfDNA procedente de plasma (perfil de Bioanalyzer). El ccfDNA se extrajo de 4 ml de plasma con EDTA mediante el kit QIA Symphony DSP Circulating DNA; 1 μ l del eluido se sometió a un análisis con Agilent High Sensitivity DNA Chip. Eje X: tamaño de la pareja de bases (bp); eje Y: unidades de fluorescencia (FU).

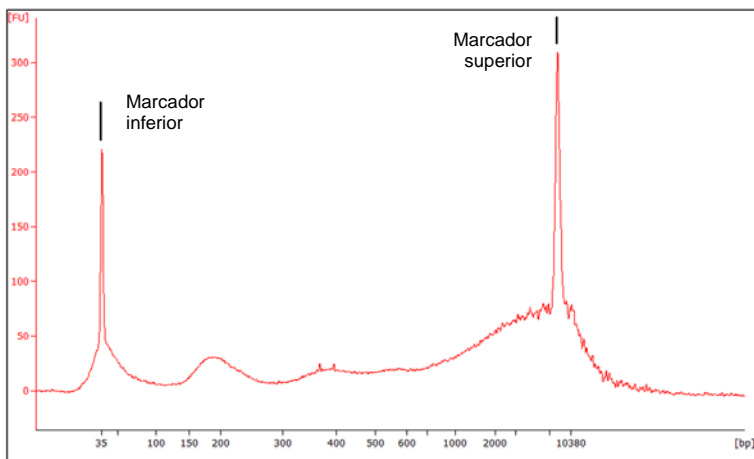


Figura 6. Distribución de tamaños de ccfDNA procedente de orina (perfil de Bioanalyzer). El ccfDNA se extrajo de 4 ml de orina estabilizada mediante el kit QIA Symphony DSP Circulating DNA; 1 μ l del eluido se sometió a un análisis con Agilent High Sensitivity DNA Chip. Eje X: tamaño de la pareja de bases (bp); eje Y: unidades de fluorescencia (FU).

Estabilidad del eluido

Se evaluó la estabilidad del eluido para el kit QIASymphony DSP Circulating DNA 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 (microtubos de elución CL 96); n.º de catálogo 19588) y tubos Eppendorf® LoBind Snap Cap Safe-Lock de 1,5 ml. Los eluidos se analizaron en duplicados de 8. La estabilidad del ADN en los eluidos se determinó con un ensayo interno de PCR en tiempo real 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 7). La estabilidad del ADN en tubos LoBind no se vio afectada por una conservación a –15 hasta –30 °C que incluyó 3 ciclos de congelación y descongelación después de 7 días, un mes y dos meses (figura 8).

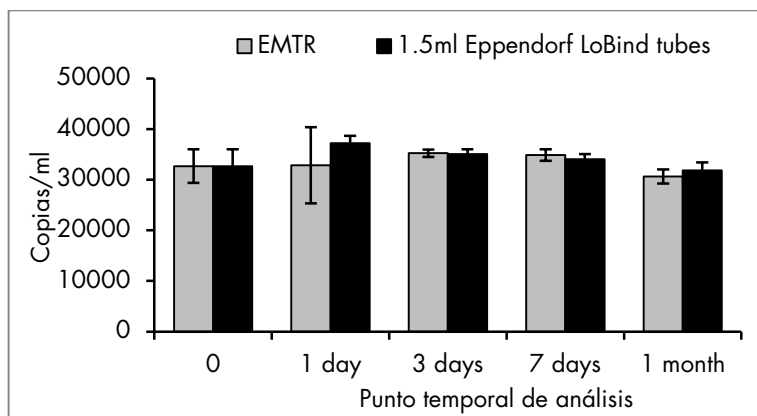


Figura 7. Estabilidad del ccfDNA en eluidos conservados a 2–8 °C en 2 formatos de tubo. El ccfDNA se extrajo de plasma con EDTA mediante el kit QIASymphony DSP Circulating DNA y se conservó a 2–8 °C para diferentes puntos temporales del análisis. El ccfDNA se cuantificó con un ensayo interno de PCR en tiempo real para la secuencia de codificación 18S. Los resultados se calcularon como copias objetivo por ml de plasma introducido.

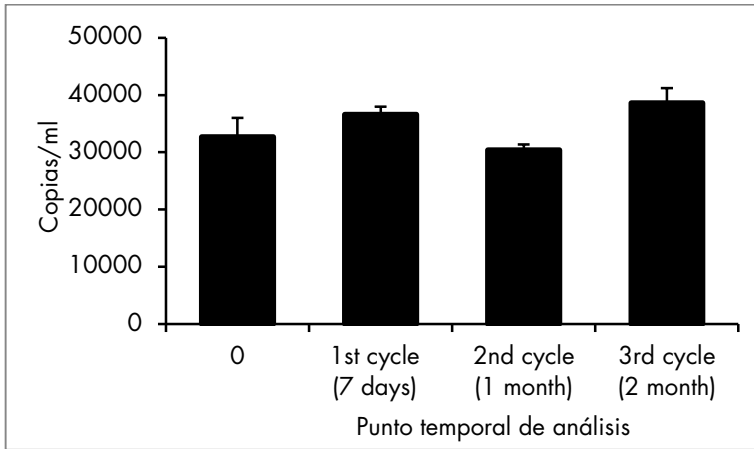


Figura 8. Estabilidad del ccfDNA en eluidos conservados a -15 hasta -30 °C, incluidos 3 ciclos de congelación y descongelación. El ccfDNA se extrajo de plasma con EDTA mediante el kit QIA Symphony DSP Circulating DNA y se conservó a -15 a -30 °C en tubos Eppendorf LoBind de 1,5 ml. La cantidad de ccfDNA 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 PCR en tiempo real para la secuencia de codificación 18S. Los resultados se calcularon como copias objetivo por ml de plasma introducido.

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o el manual del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales 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 al distribuidor local.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Eppendorf® (Eppendorf AG).

No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc., que se utilizan en este documento no están protegidos por la ley aunque no se hayan identificado específicamente como tales.

02/2017 HB-2309-D01-001

© 2017 QIAGEN, reservados todos los derechos

