

# Instrucciones de uso del QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating NA Kit (características del rendimiento)

Versión 2



Para uso diagnóstico in vitro

Para uso con el QIAamp DSP Circulating NA Kit



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemania

R1

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

## Introducción general

El QIAamp DSP Circulating NA Kit es un sistema que utiliza la tecnología de membrana de sílice (tecnología QIAamp) para el aislamiento manual y la purificación de ADN y ARN libre circulante (circulating, cell-free, ccf) procedente de muestras de plasma sanguíneo humano.

Este producto está destinado a ser utilizado por usuarios profesionales, como técnicos y médicos que hayan recibido formación en técnicas de biología molecular.

El QIAamp DSP Circulating NA Kit se ha diseñado para diagnóstico *in vitro*.

## Rendimiento de ácidos nucleicos purificados

Las muestras de plasma pueden mostrar una alta varianza en el rendimiento de ácidos nucleicos purificados. Por tanto, en el laboratorio los usuarios deben optimizar el plasma introducido y el volumen de elución para su analito específico y la aplicación posterior.

Si se utiliza el kit junto con una aplicación QIAGEN® posterior, consulte el correspondiente manual de uso para obtener instrucciones.

# Análisis de aplicaciones posteriores

Los ácidos nucleicos aislados mediante el QIAamp DSP Circulating NA Kit están listos para utilizarse en las distintas aplicaciones posteriores. Para evaluar su rendimiento, se aislaron los ácidos nucleicos del plasma sanguíneo humano de un único donante con tres tubos distintos de recogida de sangre (BD Vacutainer® K2EDTA Tube, Becton Dickinson and Company; PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX GmbH; y Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®, Streck; n = 24 donantes cada uno). Se analizaron los eluidos de 1 ml de plasma introducido mediante PCR cuantitativa (quantitative PCR, qPCR, Figura 1A), PCR digital en nanogotas (Digital Droplet PCR, ddPCR, Figura 1B), así como mediante transcripción inversa (Reverse Transcription qPCR, RT-qPCR) para ARN (solo el plasma del BD Vacutainer K2EDTA Tube, Figura 2).

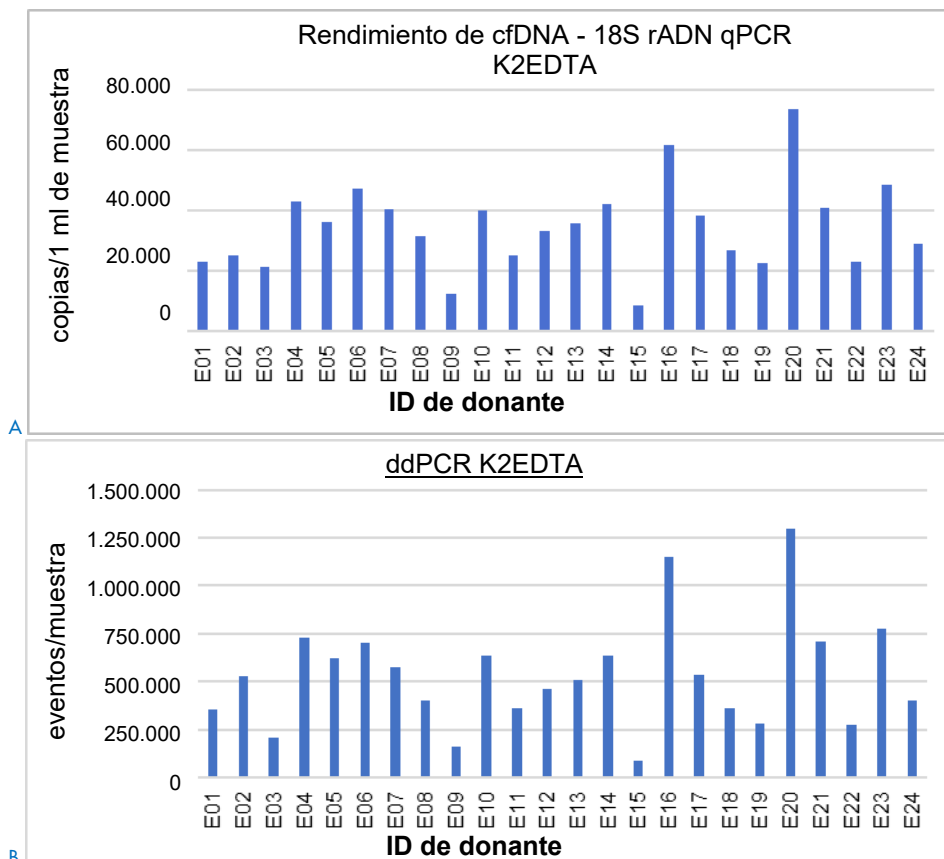


Ilustración 1. Comparación del plasma de un único donante (1 ml introducido) entre qPCR y ddPCR (Bio-Rad®)

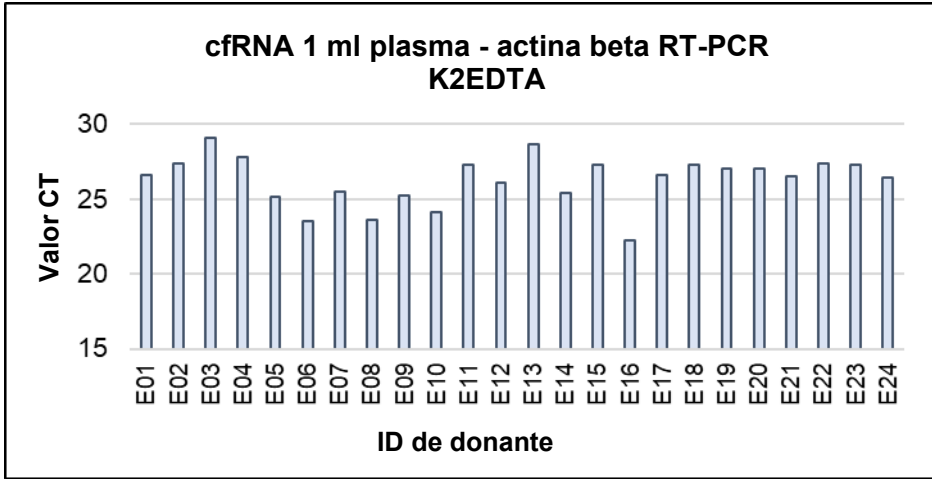


Ilustración 2. Detección de ARN extracelular en el plasma de un único donante (1 ml introducido) mediante un ensayo con RT-qPCR del gen humano de la actina beta (longitud de fragmentos de 293 bp).

Se generaron eluidos de un volumen de entrada de plasma de 5 ml para el análisis de secuenciación de alto rendimiento (Next-Generation Sequencing, NGS) (BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube y Streck Cell-Free DNA BCT; n = 8 donantes cada uno). El total del rendimiento de ADN para 5 ml de plasma se encontraba entre 50 ng y 150 ng de ADN detectado con el ensayo mediante Qubit® HS dsDNA. El análisis NGS se realizó con el GeneRead® QIAAct Actionable Insights Tumor Panel y el sistema GeneReader®. Se enriquecieron todas las muestras y se generaron genotecas. Más del 98 % de las lecturas generadas se asignaron al genoma humano y >99,8 % de las posiciones en regiones de interés tenían una cobertura de base de  $\geq 500$  x.

Se observó una aplicación correcta de tecnologías de fase posterior para ambas especies de ácidos nucleicos (ADN y ARN) (Figura 3).

	qPCR	ddPCR	RT-qPCR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
PAXgene	✓	✓	no probado	✓
Streck	✓	✓	no probado	✓

Ilustración 3. Uso satisfactorio de ácidos nucleicos aislados con distintas aplicaciones posteriores.

El usuario debe optimizar el plasma introducido y el volumen de elución para su molécula diana y cualquier procedimiento posterior que se vaya a realizar en el laboratorio o debe consultar el rendimiento específico de la aplicación posterior relevante.

## Estabilidad del eluido

La estabilidad del eluido dependerá del contenido y del tipo de ácidos nucleicos aislados, del volumen de elución y de las condiciones de almacenamiento. Recomendamos que los usuarios determinen la estabilidad del eluido según sus requisitos particulares.

Se analizaron la estabilidad del eluido para el ADN y los eluidos derivados del plasma humano generados a partir del BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson and Company) y los tubos estabilizantes de recogida de sangre (PAXgene Blood ccfDNA Tube y Streck Cell-Free DNA BCT). Se almacenaron los eluidos entre  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y entre  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No se observó deterioro hasta los 12 meses. Los eluidos almacenados a  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a temperatura ambiente ( $15-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) se mantuvieron estables hasta un máximo de 48 horas. Todas las condiciones se evaluaron mediante qPCR manipulando el gen 18S rADN humano.

Se analizaron la estabilidad del eluido para el ARN y los eluidos derivados del plasma humano generados a partir de los BD Vacutainer K2EDTA Tubes (Becton Dickinson and Company). Se almacenaron los eluidos entre  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y entre  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No se observó deterioro hasta los 6 meses. Los eluidos almacenados a  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  se mantuvieron estables hasta un máximo de 48 horas. Todas las condiciones se evaluaron mediante RT-qPCR manipulando el gen humano de la actina beta.

Si se utiliza el kit junto con aplicaciones QIAGEN posteriores, consulte el correspondiente manual de uso del kit para obtener instrucciones.

## Precisión del aislamiento de ácidos nucleicos

Se evaluó la precisión empleando plasma humano y las condiciones se evaluaron mediante qPCR manipulando el gen 18S rADN humano.

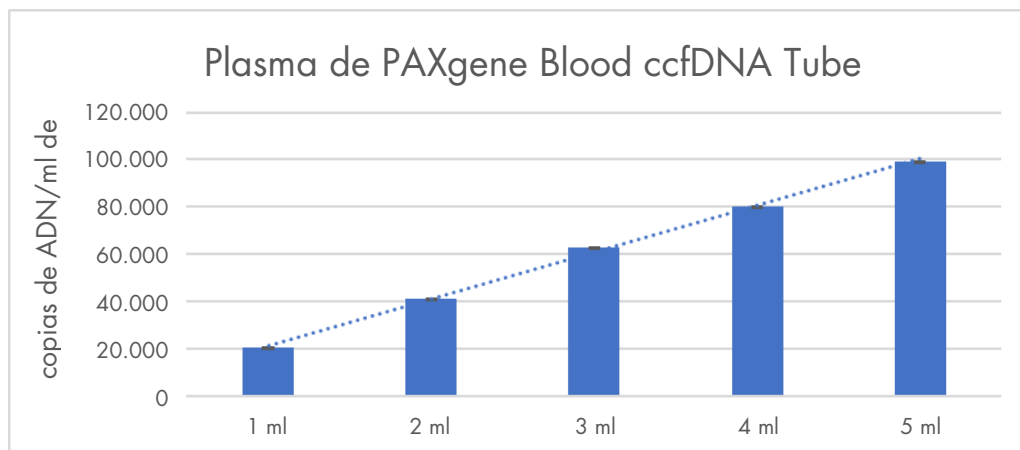
La configuración experimental comprendía 12 series de purificación y 12 duplicados cada una (un total de 144 purificaciones). Las series de purificación se planificaron con tres operarios distintos en tres días distintos con tres instrumentos distintos y utilizando tres lotes distintos del QIAamp DSP Circulating NA Kit. Se calculó la desviación estándar (Standard Deviation, SD) y el coeficiente de variación (Coefficient of Variation, CV) para cada parámetro y para la variabilidad total del QIAamp DSP Circulating NA Kit (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de precisión

Parámetro	Precisión		
	Media de copias/ml	DE	CV (%)
Entre series	25.894	461	1,78
Entre operarios		1392	5,38
Entre instrumentos		228	0,88
Entre días		2096	8,09
Entre lotes		969	3,74
Total		3120	12,05

## Linealidad

Se han generado datos para el volumen de entrada de plasma de 1-5 ml almacenado en los BD Vacutainer K2EDTA Tubes, PAXgene Blood ccfDNA Tubes y en los Streck Cell-Free DNA BCT. Se observó un aumento lineal del rendimiento del ADN en todos los BCT (consulte la Figura 4); esto también se produjo en el ARN en los BD Vacutainer K2EDTA Tubes.



**Ilustración 4. Aumento lineal del rendimiento del ADN total (copias de ADN/ml de plasma introducido) para distintos volúmenes de entrada de plasma.** Los datos observados del plasma generado a partir del PAXgene Blood ccfDNA Tube, resultados equivalentes del plasma derivado del BD Vacutainer K2EDTA Tube (DNA/RNA) y del Streck Cell-Free DNA BCT.

## Equivalencia de protocolos (protocolos Breeze y clásico)

La equivalencia de rendimiento entre el protocolo Breeze y el protocolo clásico se calculó al demostrar que el límite de confianza del 95 % correspondiente de la diferencia en la media del valor de Ct (ARN) o en la media de copias/ml (ADN) estaba dentro de  $\pm 2 \times SD$ , y el valor SD era la precisión observada del protocolo clásico (condición de referencia). Se emplearon tres lotes del kit y fueron tres operarios quienes llevaron a cabo los experimentos.

La precisión total (SD) de los valores Ct generados para el protocolo Breeze fue inferior al límite superior del intervalo de predicción del 95 % bilateral para la precisión total (SD) del protocolo clásico, en el que el intervalo de predicción se calculó dentro del estudio utilizando los datos del protocolo clásico ( $n = 143$ ) y el número de puntos de datos del protocolo Breeze ( $n = 144$ ) en el estudio.

## Sustancias interferentes

Las sustancias potencialmente interferentes pueden proceder de distintas fuentes, por ejemplo, metabolitos, naturales, sustancias introducidas durante el tratamiento del paciente o sustancias que el mismo paciente ha ingerido. Se probaron como componentes endógenos para el QIAamp DSP Circulating NA Kit la hemoglobina, los triglicéridos, el EDTA, la cafeína, la albúmina, la bilirrubina conjugada y la bilirrubina libre. No se observaron interferencias al aplicar qPCR como aplicación posterior. Además, no se derivaron interferencias de los componentes del QIAamp DSP Circulating NA Kit (proteinasas K, Buffer ACL, Buffer ACB, Buffer ACW1, Buffer ACW2 y etanol) durante el procesamiento de muestras y la extracción de ácido nucleico.

Debido a la complejidad de las sustancias potencialmente interferentes y de la diferente sensibilidad de las aplicaciones posteriores específicas, recomendamos que los usuarios evalúen el efecto de las sustancias interferentes específicas para su propio flujo de trabajo y validen un método de control de interferencias en su aplicación posterior de diagnóstico específica.

Consulte los manuales de uso del kit correspondiente para obtener más información sobre las sustancias interferentes en aplicaciones posteriores de QIAGEN específicas.

## Contaminación cruzada

Para evaluar el nivel de contaminación cruzada se añadieron 105 copias del virus de la hepatitis B (VHB) a 5 o 2 ml de plasma sanguíneo humano (muestras positivas) y se aislaron de manera adyacente a muestras sin virus (muestras negativas) en una distribución como la de un tablero de ajedrez donde se alternaban las series de extracción que contenían solo muestras negativas (para evaluar la contaminación cruzada de series de intraextracción e interextracción). El estudio tenía como fin simular las condiciones en las que muestras con un nivel elevado de moléculas diana de un ácido nucleico pueden realizar una contaminación cruzada de otras muestras durante del procedimiento de extracción. La purificación de ácidos nucleicos se llevo a cabo utilizando un lote de reactivos. La contaminación cruzada se evaluó mediante el *artus*<sup>®</sup> HBV RG CE PCR Kit. Los resultados mostraron ausencia de contaminación cruzada en todo el sistema.

## Símbolos



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



Fabricante

Rn

"R" es la revisión de las Instrucciones de uso (características del rendimiento) y "n" es el número de revisión



# Historial de revisiones del documento

Revisión	Descripción
R1, junio de 2022	Actualización para el QIAamp DSP Circulating Kit V2 en cumplimiento con IVDR Adición del aislamiento "manual" en el uso previsto. Sin cambios en los datos de rendimiento en comparación con la versión 1 del kit.

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®, QIAamp®, artus®, GeneRead®, GeneReader® (QIAGEN Group); Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); PAXgene® (PreAnalytiX GmbH); Streck®, Cell-Free DNA BCT® (Streck Inc.); Qubit® (Thermo Fisher Scientific o sus filiales). 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.

06/2022 HB-3049-D01-001 © 2022 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

