



# Extracción y detección exitosa de biomarcadores en biopsia líquida con PCR Digital



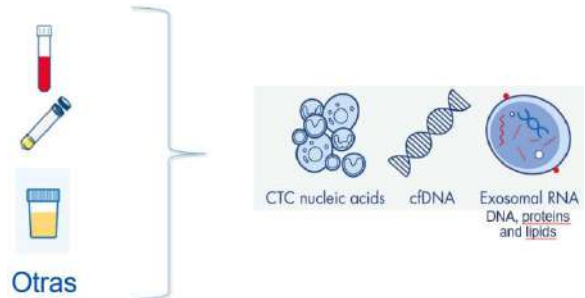
El ADN libre circulante (cfDNA) se usa ampliamente como analito en aplicaciones de investigación de biopsia líquida, también el ARN libre (cfRNA), células tumorales circulantes (CTC), exosomas y otras vesículas extracelulares (EV) y sus contenidos han ganado relevancia para estudios de biomarcadores aumentando nuestra comprensión de los procesos moleculares subyacentes, sin embargo, los desafíos en el flujo de trabajo, tales como determinar el método de extracción y de detección más adecuados, todavía deben ser superados.

Qiagen se enfocó en estos desafíos y estableció soluciones para el flujo de trabajo combinando su excelente desempeño en extracción de ácidos nucleicos y su última tecnología en detección y cuantificación: la PCR digital, incorporando además ensayos validados wet lab ofreciendo así una solución completa para identificar y monitorear factores pronósticos y predictivos que ayudarán a seleccionar la estrategia terapéutica óptima para cada paciente individual.

Diversos biofluidos, incluido el suero sanguíneo, el plasma

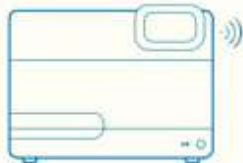
y la orina se pueden utilizar para el análisis de biomarcadores, la elección del tipo de muestra depende del objetivo de la investigación y contexto de la enfermedad.

### Biopsia líquida



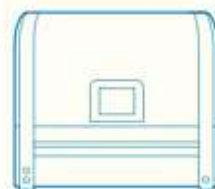
La obtención de resultados precisos requiere una recolección adecuada y métodos de extracción confiables dado los ácidos nucleicos están presentes solo en cantidades muy bajas y su nivel puede cambiar por manipulación o extracción subóptima de las muestras. Qiagen ofrece kits y equipos especializados para biopsia líquida con los que se puede realizar extracción manual o automatizada. (Vea tabla 1: Kits de extracción).

### Preparación automatizada de aislamiento de ácidos nucleicos



#### EZ2 Connect

- Extracción por medio de perlas
- Purifique 1 a 24 muestras
- Cartuchos de reactivos precargados
- Alta sensibilidad en un volumen de hasta 8 ml



#### QIASymphony SP

- Extracción por medio de perlas
- Procesa 1 a 96 muestras
- Cartuchos de reactivos precargados
- Protocolos validados para 2 ml y 4 ml, protocolos personalizados (hasta 10 ml)



#### QIAcube Connect

- Extracción por medio de columnas
- Preparación de hasta 12 muestras
- Automatice más de 80 kits con más de 140 protocolos para ADN, ARN y proteínas
- Procesa hasta 10 ml de volumen

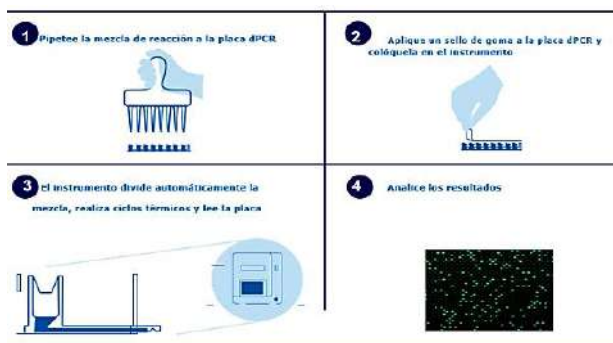
## Análisis de biopsia líquida por dPCR

Las tecnologías tradicionales se enfrentan a varios desafíos como la calidad y cantidad variable de las muestras. Qiagen, después de garantizar una buena extracción de ácidos nucleicos, ofrece la PCR digital, un avance en precisión y sensibilidad que permitirá identificación de cáncer residual por debajo de los niveles de detección actuales, detección de nuevas mutaciones y monitoreo de mutaciones raras de resistencia a medicamentos, por medio de diferentes tipos de ensayos y análisis de datos.

Technique	Sensitivity	Optimal application
Sanger sequencing	>10%	Tumor tissue
Pyrosequencing	10%	Tumor tissue
Next-generation sequencing	2%	Tumor tissue
Quantitative PCR	1%	Tumor tissue
ARMS	0.10%	Tumor tissue
Digital PCR	0.1% or lower	ctDNA, rare variants in tumor tissue

## Un flujo de trabajo simple y rápido

El sistema de PCR digital QIAcuity basado en nanoplacas proporciona un flujo de trabajo similar a qPCR, en el que la manipulación de la muestra solo incluye la preparación de la mezcla de reacción que se pone en una nanoplaca de 8 o 24 pocillos con 26000 particiones, se sella y se lleva al equipo. El sistema entonces automatiza un flujo de trabajo de dPCR totalmente integrado: partición, termociclado y toma de imágenes; permitiendo operación



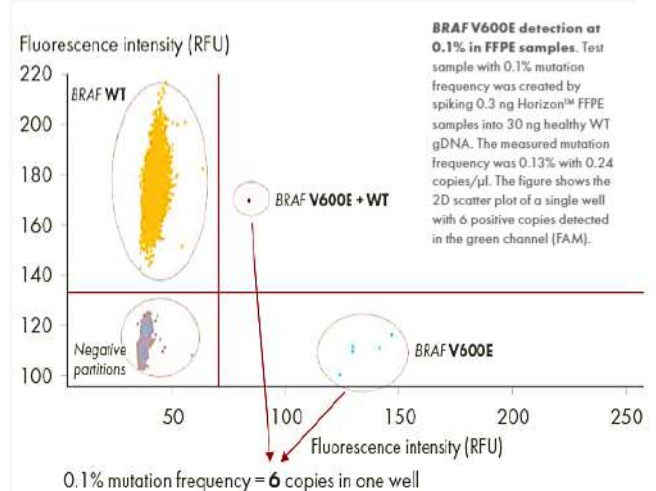
independiente y entrega de resultados en alrededor de dos horas.

## Ensayos de Mutación LNA

Ensayos dúplex prediseñados que detectan secuencias wild type y mutadas, con combinaciones de dos dyes que permiten detección de dos targets en la misma reacción. Los primers y sondas son diseñados con tecnología LNA (Locked Nucleic Acid) que son más cortos permitiendo una estabilidad térmica sin precedentes cuando se hibridan con su complemento, incrementan la especificidad y sensibilidad y tienen mayor resistencia a las endonucleasas y exonucleasas.

Elija combinaciones de colorantes fluorescentes FAM y HEX o Atto 550 y ROX.

Vea tabla 2: Ensayos validados wet lab con sensibilidad de menos de 0.1%.



## Ensayos CNV (Copy Number Variation)

Ensayos con tecnología LNA para un gen individual o región de interés, prediseñados para todos los genes en el genoma humano, elija entre 3 ubicaciones de diseño por gen: 5', medio y 3'.

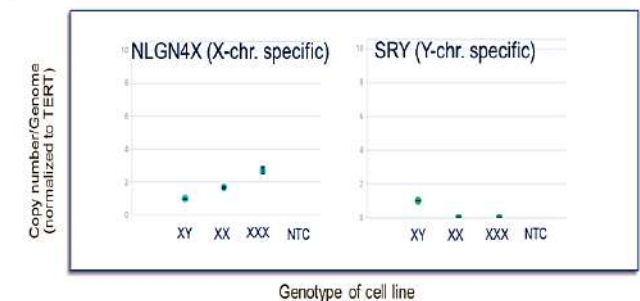


Figure 13. dPCR Copy Number Assays accurately identify aneuploidy. dPCR Copy Number Assays designed to target NLGN4X and SRY genes, which are on X and Y chromosomes, were tested using 3 Coriell templates with XY, XX, and XXX genotypes. TERT assay was used as reference assay, with stable copy numbers across all three XY, XX, and XXX genotypes. dPCR Copy Number Assays accurately measured single-copy changes and detected 1 copy, 2 copies, and 3 copies of NLGN4X gene in XY, XX, and XXX templates, respectively. Single copy of SRY gene was only detected in XY template but not in others, as expected.

## Tabla1. Kits de extracción biopsia líquida

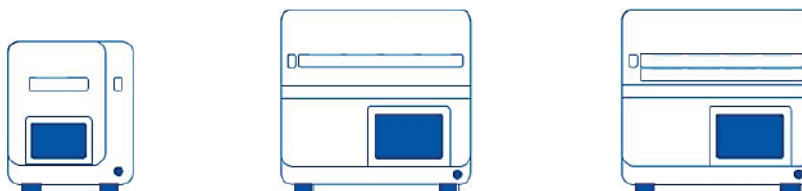
Kit	Aplicabilidad	Método de extracción	Manejo
AllPrep DNA/mRNA Nano	Aislamiento simultáneo de gDNA y mRNA a partir de CTC.	Perlas magnéticas	Manual
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Aislamiento de cfDNA, cfRNA, cfmiRNA a partir de orina, plasma o suero humano.	Columnas de sílice	Manual o automatizado con QIAcube Connect.
QIAamp® MinElute ccfDNA Mini Kit	Aislamiento de cfDNA a partir de plasma o suero humano.	Columnas de sílice	Manual o parcialmente automatizado con QIAcube connect.
QIAamp MinElute ccfDNA Midi Kit	Aislamiento de cfDNA a partir de plasma o suero humano.	Columnas de sílice	Manual o parcialmente automatizado con QIAcube connect.
EZ1&2 ccfDNA Kit	Aislamiento de cfDNA a partir de plasma o suero humano.	Perlas magnéticas	Manual o automatizado con EZ2.
QIAamp ccfDNA/RNA Kit	Aislamiento de cfDNA y cfRNA a partir de plasma y suero.	Columnas de sílice	Manual o parcialmente automatizado con QIAcube connect.
QIASymphony DSP Circulating DNA Kit	Aislamiento de cfDNA a partir de orina o plasma.	Perlas magnéticas	Manual o automatizado con QIASymphony SP.
QIAamp DSP Circulating NA Kit	Aislamiento de cfDNA a partir de plasma o suero humano.	Columnas de sílice	Manual
QIAseq™ cfDNA All-inOne Kit	Aislamiento de cfDNA preparación de librerías para NGS.	Membrana	Manual o parcialmente automatizado con QIAcube connect.
exoRNeasy Midi and Maxi Kits	Aislamiento de ARN de exomas de suero, plasma, células, orina o LCR.	Membrana	Manual o automatizado con QIAcube Connect.
exoEasy Maxi Kit	Aislamiento de exomas y otras vesículas extracelulares (VE) del plasma, suero y sobrenadante de cultivo celular.	Membrana	Manual
miRCURY Exosome Kits	Aislamiento de exomas y otras vesículas extracelulares de muestras de suero, plasma, células, orina o LCR.	Membrana	Manual

## Tabla 2. Ensayos validados wet lab

GENES		MUTACIONES					
ABL1	c.821A>T	c.1001C>T	c.814T>C	c.820G>A			
BRAF	c.1798_1799 delinsAA	c.1798_1799 delinsAG	c.1799_180 OdelinsAA	c.1799T>A	c.1799_180 OdelinsAT	c.1406G>C	c.1799T>G
	c.1798G>A						
BTK	c.1544G>C	c.1543T>C					
CDKN2A	c.358G>T	c.143C>T					
DNMT3A	c.2711C>	c.2644C>T	c.2645G>A				
EGFR	c.2582T>A	c.2389T>A	c.2125G>A	c.2390G>C	c.2155G>A	c.2156G>C	c.2235_2248 delinsAATTC
	c.2237_2254del	c.2239_2251delinsC	c.2238_2252delinsGCA	c.2239_2256del	c.2253_2276del	c.2235_2251 delinsAATTC	c.2233_2247del
	c.2369C>T	c.2238_2255del	c.2237_2253 delinsTTGCT	c.2236_2250del	c.2237_2255 delinsT	c.2310_2311insGGT	c.2236_2253del
	c.2239_2256delinsCAA	c.2238_2248delinsGC	c.2237_2251del	c.2235_2252delinsAAT	c.2239_2247del	c.2240_2257del	c.2239_2258 delinsCA
	c.2126A>C	c.2309_2310 delinsCCAG CGTGGAT	c.2237_2257delinsTCT	c.2240_2254del	c.2235_2249del	c.2155G>T	c.2239_2248delinsC
	c.2237_2252delinsT	c.2239_2248delinsC	c.2303G>T	c.2573T>G	c.2126A>T		
FLT3	c.1471G>C	c.2503G>T	c.2504A>T	c.2503G>C	c.2028C>A	c.2492G>A	c.2505T>A
	c.1775T>C	c.1352C>T	c.2525A>G	c.2505T>G	c.970G>A	c.2501G>A	
IDH1	c.395G>T	c.394C>G	c.394C>A	c.394_395 delinsGT	c.299G>A		
IDH2	c.515G>T	c.419G>A	c.514A>T	c.515G>A	c.514A>G	c.516G>T	
JAK2	c.1849G>T						
KRAS	c.182A>C	c.182A>G	c.183A>C	c.183A>T	c.181C>G	c.37G>T	c.182A>T
	c.34G>C	c.35G>T	c.35G>A	c.35G>C	c.38G>A	c.181C>A	c.34G>T
	c.37G>A	c.37G>C	c.38G>C	c.34G>A	c.38_39 delinsAT	c.38G>T	
MET	c.3083-52_3083-51insCT						
NOTCH1	c.7541_7542del	c.5033T>C	c.4775T>C	c.931A>C	c.4793G>C	c.4847T>A	c.1718A>C
	c.580A>C						
NRAS	c.183A>C	c.182A>G	c.34G>T	c.34G>A	c.182A>T	c.34G>C	c.35G>C
	c.35G>T	c.37G>C	c.37G>T	c.38G>A	c.38G>T	c.38G>C	c.181C>G
	c.183A>T	c.181C>A	c.37G>A				
PIK3CA	c.1035T>A	c.1634A>G	c.3129G>T	c.3140A>G	c.1636C>A	c.3145G>C	c.3140A>T
	c.263G>A	c.2176G>A	c.3139C>T	c.333G>T	c.1637A>G	c.1093G>A	c.1633G>A
	c.1634A>C	c.241G>A	c.3075C>T				
PTEN	c.388C>T	c.697C>T	c.388C>G				
TP53	c.574C>T	c.818G>A	c.814G>A	c.578A>G	c.488A>G	c.818G>T	c.455C>T
	c.469G>T	c.517G>T	c.713G>T	c.527G>T	c.892G>T	c.473G>T	c.856G>A
	c.747G>T	c.833C>T	c.711G>T	c.733G>T	c.734G>T	c.464C>A	c.745A>T
	c.746G>T	c.743G>T	c.461G>T	c.481G>A	c.659A>G	c.733G>A	c.614A>G
	c.641A>G	c.725G>T	c.473G>A				
WT1	c.1105C>T	c.1390G>A	c.1385G>C	c.1385G>A	c.1372C>T	c.1142C>A	c.1110dup
	c.1141_1144dup						

## Una solución de dPCR totalmente integrada:

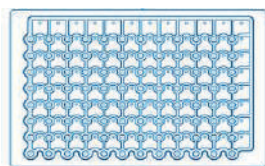
### Instrumentos QIAcuity



	QIAcuity One	QIAcuity Four	QIAcuity Eight
<u>Nro</u> de platos que procesa	1	4	8
Canales de detección	2 o 5	5	5
<u>Termocicladores</u>	1	1	2
Tiempo para resultado	Aprox. 2 h	Primer plato en aprox. 2 h Cada 80 minutos del plato siguiente.	Primer plato en aprox. 2 h Cada 40 minutos del plato siguiente.
Rendimiento ( <u>Nro</u> de muestras en un día de trabajo)	Hasta 384 (96-pozos) Hasta 96 (24- pozos)	Hasta 672 (96- pozos) Hasta 168 (24-pozos)	Hasta 1248 (96- pozos) Hasta 312 (24- pozos)

### dPCR en nanoplacas

El sistema QIAcuity ofrece distintas configuraciones de nanoplacas con formatos de muestra flexibles. Las particiones fijas y selladas evitan la variación de tamaño, la coalescencia y la contaminación entre pozos. Una detección más rápida es posible gracias a la lectura simultánea de todas las particiones de una muestra. Se pueden agrupar varios pozos y analizar como uno solo con más particiones para lograr mayor precisión, esta función de hiperpozo es útil para la detección de eventos raros, sobre todo cuando el volumen de muestra a analizar excede el volumen de carga.



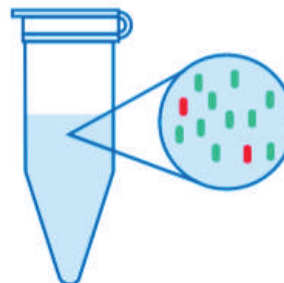
#### Plato para biopsia líquida

Nanoplaaca 26 k  
Aprox 26,000particiones  
8 o 24 muestras por placa  
Volumen de 40uL  
Para mayor cantidad de muestra

### QIAcuity Probe PCR Kit

Mezcla maestra concentrada a 4x, lo que permite trabajar con una mayor cantidad de muestra, ideal para analitos en muy baja concentración como en el caso de muestras de biopsia líquida.

Diseñada para singleplex y multiplex (hasta 5 canales de detección). Optimizada para un mejor rendimiento en microfluidos de nanoplacas. Incluye colorante de referencia especial necesario para análisis de PCR digital y conteo de particiones analizables. Disponible para uso con sus primers y sondas de rutina, con nuestros ensayos validados wet lab o con oligonucleotidos creados en Geneglobe.



Escríbenos a:  
serviciocliente@annardx.com  
PBX: (1)744 7979  
Línea gratuita nacional:  
018000 189 999  
Sede principal: Av. Cl 20 No.39-79  
Bogotá - Colombia

in Annar | annarht  
 Annar Health Technologies

[www.annardx.com](http://www.annardx.com)