

Instructions d'utilisation (caractéristiques de performance) du QIASymphony® DSP Circulating DNA Kit

Version 2



Pour utilisation diagnostique in vitro
À utiliser avec le QIASymphony DSP Circulating DNA Kit



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Allemagne

R1

Les caractéristiques de performance sont disponibles sous forme électronique et se trouvent dans l'onglet Resource (Ressources) de la page des produits à l'adresse www.qiagen.com.

Introduction générale

Le système QIAasymphony DSP Circulating DNA est un système in vitro prêt à l'emploi pour la purification qualitative de l'ADN libre circulant (ADNlc) à partir de l'urine et du plasma humains.

Le QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit est prévu exclusivement pour une utilisation sur l'appareil QIAasymphony SP.

Le QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit fournit des réactifs pour la purification entièrement automatique et simultanée d'ADNlc d'une vaste gamme de types de plasma humain (avec stabilisateurs de profil d'ADNlc, par ex. Cell-Free DNA BCT® de Streck® ainsi que sans stabilisateurs de profil d'ADNlc, par ex. tubes d'EDTA) et d'urine humaine (avec et sans stabilisateurs de profil d'ADNlc). Cependant, les caractéristiques de performance n'ont pas été établies pour tous les tubes de prélèvement sanguin et doivent être validées par l'utilisateur.

L'ADNlc purifié est compatible avec une large gamme d'applications en aval, telles que les analyses chimiques PCR, les dosages de quantification par fluorescence ou NGS.

Le poste de travail QIAasymphony SP exécute toutes les étapes de la procédure de purification. Il est possible de traiter jusqu'à 96 échantillons, par lot de 24, en un seul cycle. Les échantillons d'urine peuvent nécessiter un traitement manuel préalable.

Remarque : les caractéristiques de performance dépendent fortement de divers facteurs et sont liées à l'application spécifique en aval. Elles ont été établies pour le QS DSP Circulating DNA Kit en association avec des applications en aval exemplaires. Cependant, les méthodes d'isolation des acides nucléiques des échantillons biologiques sont utilisées comme solution initiale pour plusieurs applications en aval ; les paramètres de performances, par exemple la contamination croisée et la précision des cycles, doivent être établis pour tout flux de travail dans le cadre du développement de l'application en aval. L'utilisateur est donc responsable de valider l'ensemble du flux de travail afin d'établir les paramètres de performances appropriés.

Performances de base

Les performances de base du QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit ont été évaluées pour l'extraction de l'ADNlc à partir de 4 ml de plasma Streck ainsi que de 4 ml d'urine stabilisée provenant de 48 dons unitaires. Le rendement en ADNlc a été déterminé par real-time PCR maison pour la séquence codante d'ARN ribosomique 18S.

Les différences de rendement (\log_{10} copies/ml) illustrées à la figure 1 (4 ml de plasma) et à la figure 2 (4 ml d'urine) reflètent l'importante dépendance vis-à-vis du donneur des concentrations en ADNlc habituelle pour le même volume dans les différents échantillons.

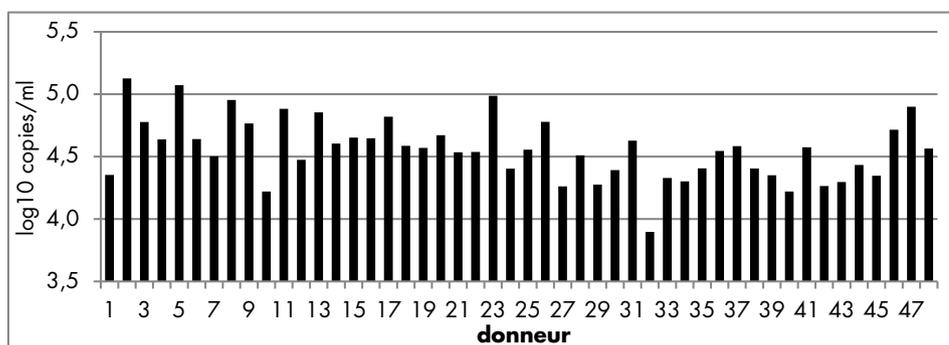


Figure 1. Rendement en ADNlc de 48 dons unitaires de plasma. Un don de sang de 48 donneurs a été fait dans de l'ADN sans cellules BCT (Streck). De l'ADNlc a été extrait de 4 ml de plasma avec le QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit. Le rendement en ADNlc a été quantifié en utilisant une real-time PCR maison pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en nombre de copies cibles par millilitre de volume de plasma.

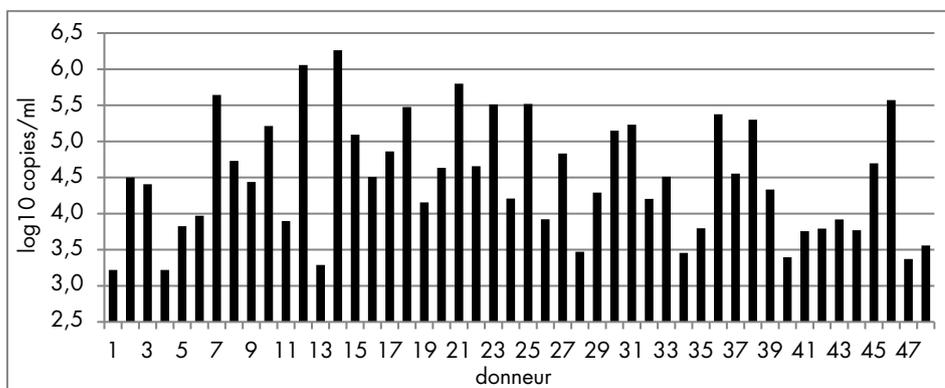


Figure 2. Rendement en ADNlc de 48 dons unitaires d'urine. L'urine prélevée à 48 donneurs uniques a été stabilisée avec du Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck). De l'ADNlc a été extrait de 4 ml d'urine avec le QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. Le rendement en ADNlc a été quantifié en utilisant une real-time PCR maison pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en nombre de copies cibles par millimètre de volume d'urine.

Précision des cycles

Les coefficients de variation (CV) ont été déterminés pour l'extraction de l'ADNlc humain à partir de plasma sur EDTA. Pour l'analyse de précision, l'ADNlc a été quantifié par real-time PCR maison pour la séquence codante ribosomique 18S. Au total, 10 cycles QIASymphony ont été réalisés en 4 lots chacun (8 échantillons identiques par lot). Le tableau 1 détaille les données de précision.

Tableau 1. Analyse des estimations de la précision

Précision	CV (%)
Dans le lot	11,67
Répétabilité	13,14
Précision intermédiaire	13,14
Précision totale	14,12

Équivalence de performance des protocoles sur volumes d'échantillon de 2 et de 4 ml

L'équivalence de performance des protocoles sur des volumes d'échantillon de 2 et de 4 ml a été évaluée pour le QIASymphony DSP Circulating DNA Kit en utilisant de l'ADNlc endogène extrait d'un mélange de plasmas sur EDTA humains. Au total, 8 cycles indépendants QIASymphony ont été réalisés en 4 lots chacun avec 8 échantillons identiques par lot. La plage linéaire de la procédure du QIASymphony DSP Circulating DNA Kit a été déterminée pour la séquence codante 18S par real-time PCR maison (Figure 3). Le rapport des différences pour les protocoles sur 2 et 4 ml figure dans le tableau 2 (Le protocole de référence porte sur un volume d'échantillon de 4 ml).

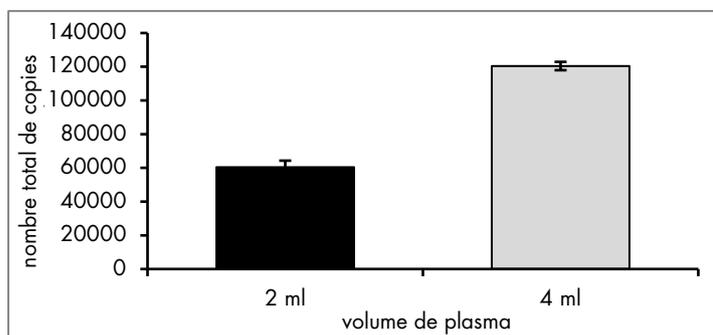


Figure 3. Équivalence de performance des protocoles sur volumes d'échantillon de 2 et de 4 ml. La plage linéaire du protocole de quantification de l'ADNlc a été déterminée pour les protocoles sur volumes d'échantillon de 2 et de 4 ml. Le rendement en ADNlc a été quantifié en utilisant une real-time PCR maison pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en nombre total de copies par protocole.

Tableau 2. Différence entre les protocoles sur volumes d'échantillon de 2 et de 4 ml (N = 256)

Paramètre	Valeur
Rapport estimé des moyennes géométriques, en nombre de copies/ml calculé	1,01
Limite de confiance inférieure à 95 %	0,92
Limite de confiance supérieure à 95 %	1,11
Précision totale	14,12

La performance des protocoles sur volumes d'échantillon de 2 et de 4 ml, mesurée en nombre de copies par millilitre calculé, est équivalente.

Répartition granulométrique

Pour évaluer la répartition granulométrique du volume d'échantillon, l'ADNlc d'un volume d'échantillon de 4 ml a été extrait en utilisant le QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, avec un volume d'éluat de 75 µl. Un volume d'éluat de 1 µl a ensuite été soumis à une analyse granulométrique sur le bioanalyseur Agilent® 2100 au moyen d'une puce à ADN à haute sensibilité d'Agilent. Au total, 5 échantillons identiques indépendants ont été évalués. Un profil ADN représentatif est présenté en [figure 4](#) pour le plasma et en [figure 5](#) pour l'urine.

L'électrophorégramme du plasma présenté à la [figure 4](#) illustre le pic fréquemment observé aux alentours de 165 bp, avec une valeur comprise entre 145 et 196 bp, ce qui correspond à la plage de longueur de l'ADN lié aux histones dans le nucléosome. L'électrophorégramme de l'urine présenté à la [figure 5](#) montre que le pic prédominant aux alentours approximativement 160 bp est plus large, avec une plage comprise entre environ 145 et 250 bp. En outre, un second pic compris entre environ 20 et 100 bp (au niveau du pic du marqueur inférieur) est présent pour l'urine, ce qui signale une fraction d'ADNlc plus fragmentée. Par ailleurs, la [figure 5](#) montre un nombre élevé de longs fragments d'ADN à partir d'environ 2 kb. Une forte proportion de ces fragments d'ADN génomique est souvent retrouvée dans les échantillons d'urine, probablement en raison de leur libération depuis les cellules présentes dans l'urine.

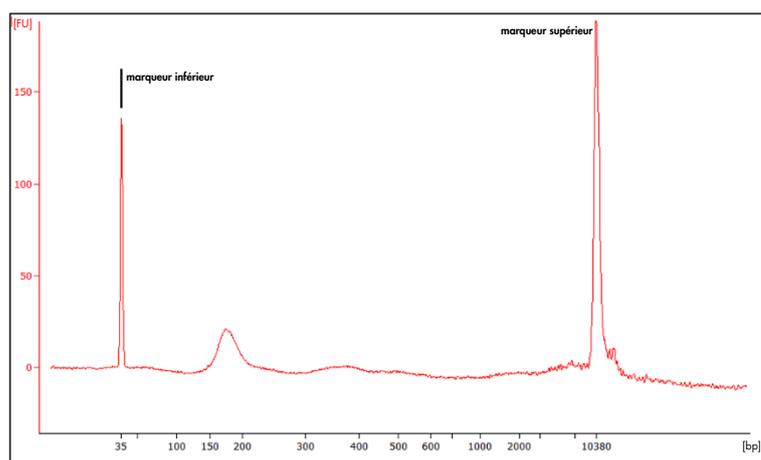


Figure 4. Répartition granulométrique de l'ADNlc issu du plasma (profil de bioanalyseur). L'ADNlc a été extrait de 4 ml de plasma sur EDTA en utilisant le QIASymphony DSP Circulating DNA Kit ; 1 µl d'éluat a été soumis à une analyse sur puce à ADN à haute sensibilité d'Agilent. Axe x : taille en paires de base (bp) ; axe des ordonnées : unités de fluorescence (FU).

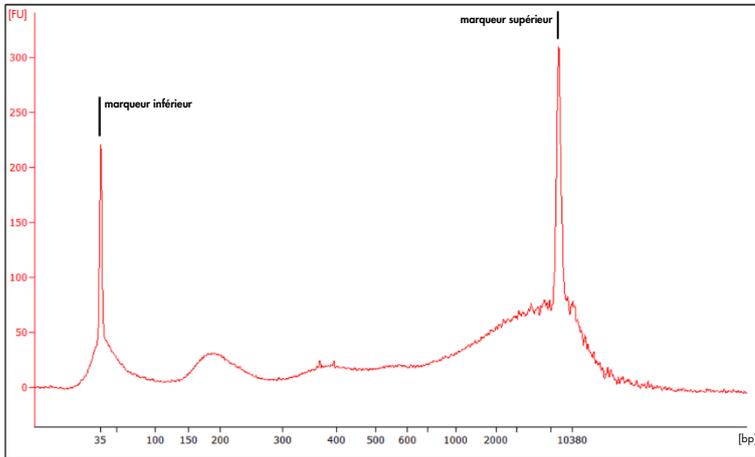


Figure 5. Répartition granulométrique de l'ADNlc issu de l'urine (profil de bioanalyseur). L'ADNlc a été extrait de 4 ml d'urine en utilisant le QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit ; 1 µl d'éluat a été soumis à une analyse sur puce à ADN à haute sensibilité d'Agilent. Axe x : taille en paires de base (bp) ; axe des ordonnées : unités de fluorescence (FU).

Stabilité des éluats

La stabilité de l'éluat a été évaluée pour le QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit en utilisant de l'ADNlc extrait d'un mélange de plasmas sur EDTA humains. Les éluats ont été stockés dans 2 formats de portoir d'éluat différents : QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96 [microtubes d'éluat CL] ; n° de réf. 19588) et tubes LoBind® à bouchon pression Safe-Lock d'Eppendorf® de 1,5 ml. Les éluats ont été analysés sur 8 échantillons identiques. La stabilité de l'ADN dans les éluats a été déterminée par real-time PCR maison pour la séquence codante d'ARN ribosomique 18S.

Ni durée de la période de stockage, jusqu'à un mois, ni le mode de stockage, n'ont influé sur la stabilité des éluats à une température comprise entre 2 et 8 °C (Figure 6). La conservation à une température comprise entre -15 °C et -30 °C, incluant 3 cycles congélation-décongélation au bout de 7 jours, un mois et deux mois, n'a eu aucun impact sur la stabilité de l'ADN dans les tubes LoBind (Figure 7).

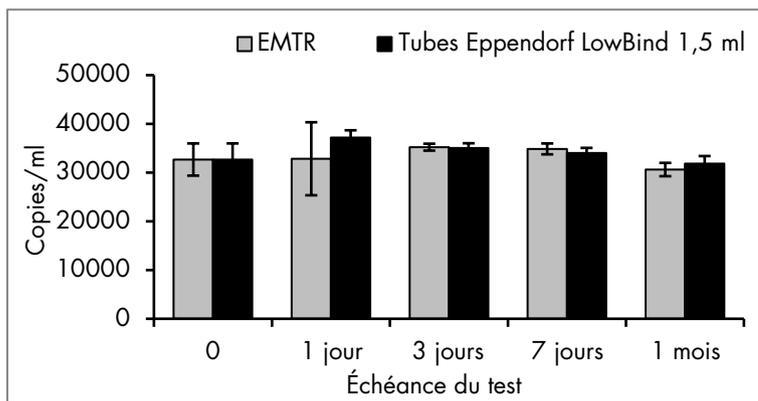


Figure 6. Stabilité de l'ADNlc dans les éluats stockés à une température comprise entre 2 et 8 °C dans 2 formats de tube. L'ADNlc a été extrait à partir de plasma sur EDTA en utilisant le QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit, puis stocké à une température comprise entre 2 et 8 °C avec différentes échéances de test. Le rendement en ADNlc a été quantifié en utilisant une real-time PCR maison pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en nombre de copies cibles par millilitre de volume de plasma.

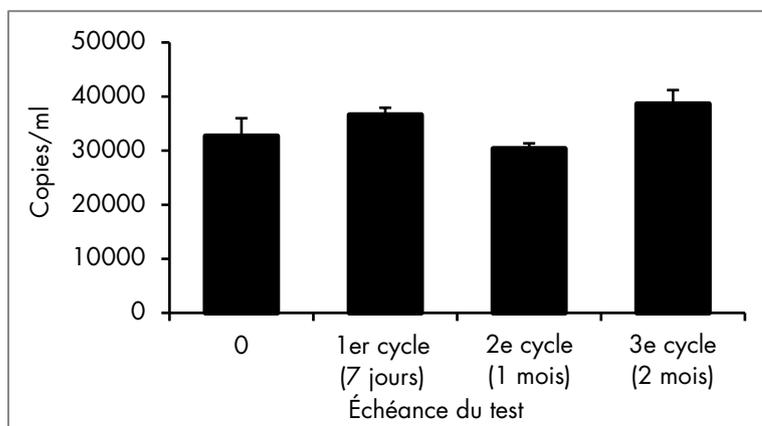


Figure 7. Stabilité de l'ADNlc dans les éluats stockés à une température comprise entre -15 °C et -30 °C avec 3 cycles congélation-décongélation. L'ADNlc a été extrait à partir de plasma sur EDTA en utilisant le QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit, puis stocké à une température comprise entre -15 °C et -30 °C dans des tubes LoBind d'Eppendorf de 1,5 ml. Le rendement en ADNlc a été déterminé à 3 échéances de test en utilisant le même éluat au bout des 3 cycles congélation-décongélation. Le rendement en ADNlc a été quantifié en utilisant une real-time PCR maison pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en nombre de copies cibles par millilitre de volume de plasma.

Substances interférentes

Le plasma et l'urine humains ont été inoculés avec différentes substances potentiellement interférentes (voir tableau 3) pour tester leur impact sur la performance d'extraction de l'ADNlc du QS DSP Circulating DNA Kit et la compatibilité ultérieure sur les dosages en aval exemplaires. Les éluats ont été analysés avec une real-time PCR maison pour la séquence codante 18S et avec le Qubit® Fluorometer avec un dosage d'ADNdb haute sensibilité.

Tableau 3. Concentrations de test des substances potentiellement interférentes

Substances interférentes	Plasma	Urine
Bilirubine	200 mg/litre*	200 mg/litre*
Hémoglobine	2 g/litre ¹	-
BSA et gammaglobuline	Jusqu'à 120 g/litre*	1 g/litre [†]
Triglycérides	5 g/litre*	-
Glucose	10 g/litre*	10 g/litre*
Sang	-	1 % [†]
pH	-	pH 4 et pH 9 [†]

* CLSI EP7-A2 Vol. 25 No. 27

[†] Ébauche de guide de la FDA (11.05.2011)

Aucune des substances répertoriées dans le tableau 3 n'interfère, à l'exception des échantillons de plasma avec de fortes concentrations de gammaglobuline (>30 g/litre) pouvant réduire la récupération de l'ADN sans cellules circulantes.

Remarque : le test a été effectué avec des applications en aval exemplaires pour une évaluation de la qualité des acides nucléiques extraits. Cependant, différentes applications en aval peuvent avoir différentes exigences en matière de pureté (c.-à-d. l'absence de substance potentiellement interférentes), l'identification et le test des substances pertinentes doivent donc également être établis dans le cadre du développement de l'application en aval pour tout flux de travail impliquant le QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit.

Contamination croisée

Le risque de contamination croisée du système QIASymphony DSP Circulating DNA a été analysé en effectuant trois cycles de 96 échantillons sur l'instrument QIASymphony SP avec des lots en damier alternatifs (en alternant les échantillons positifs et négatifs). Le plasma femelle (échantillon négatif) et le plasma femelle inoculé d'ADNg mâle divisé d'une concentration de 1,0 E+05 copies du gène SRY1 par millilitre de plasma (échantillon positif) ont été utilisés comme échantillons pour un modèle de système. Les échantillons ont été préparés selon le protocole sur 4 ml incluant deux transferts d'échantillons séparés d'un volume de 2 ml chacun. Une contamination potentielle des échantillons de plasma femelles négatifs lors des cycles d'extraction a été évaluée par une analyse ultérieure des éluats avec une real-time PCR pour le gène SRY1 spécifique du chromosome Y.

Aucune contamination croisée n'a été détectée pour un transfert d'échantillon à échantillon, de lot à lot ou de cycle à cycle.

Compatibilité avec différentes applications en aval

Des applications en aval exemplaires ont été utilisées lors du développement du QIASymphony DSP Circulating DNA Kit afin de démontrer que les acides nucléiques isolés sont compatibles avec une vaste gamme de différentes technologies d'applications en aval, y compris la PCR en temps réel (voir figure 1, figure 2, figure 3, figure 6 et figure 7), Qubit Fluorometer (dosage de protéines et dosage d'ADNdb haute sensibilité), bibliothèque (voir figure 8) et séquençage de nouvelle génération (NGS).

L'électrophorégramme dans la figure 8 montre un exemple de ligature des adaptateurs réussie, suivie d'une amplification de l'ADNlc. À côté du pic proéminent à 300 bp pour l'ADNlc nucléosomal (env. 165 plus env. 70 bp pour chaque adaptateur), on voit aussi le pic di-nucléosomal à env. 470 bp.

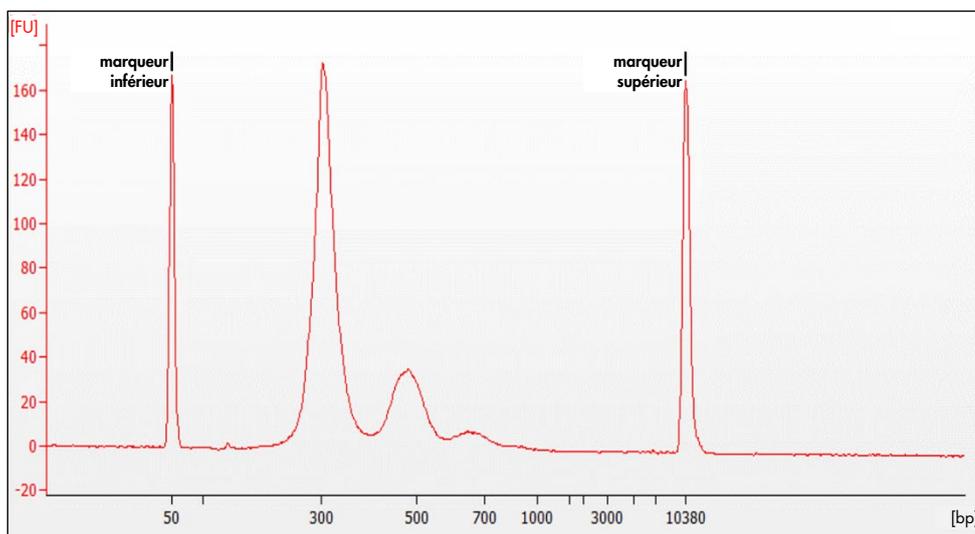
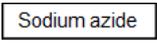


Figure 8. Bibliothèque d'ADN d'ADNlc (donneur unique) extrait avec le QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. L'ADNlc a été extrait du plasma Streck selon le protocole sur 4 ml, puis 35 µl d'éluat ont été transférés dans le NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs). Après l'amplification et le nettoyage aux XP AMPure, 1 µl d'éluat a été analysé avec l'Agilent 7500 DNA Kit.

Symboles

Les symboles suivants apparaissent dans le mode d'emploi ou sur l'emballage et l'étiquetage :

Symbole	Définition du symbole
	Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions
	À utiliser avant
	Ce produit est conforme aux exigences de la réglementation européenne 2017/746 relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Numéro de matériel (c.-à-d. étiquette de composant)
	Composants
	Contient
	Nombre
	Code article international (Global Trade Item Number, GTIN)
Rn	R désigne une révision du mode d'emploi et n représente le numéro de révision
	Limites de température
	Fabricant
	Consulter le mode d'emploi
	Avertissement/mise en garde
	Protéinase K
	Numéro du puits (c.-à-d. puits de la cartouche de réactifs)
	Cartouche de réactifs
	Azoture de sodium

Symbole

Définition du symbole

EtOH

Éthanol

UDI

Identificateur unique d'appareil

Historique des révisions

Révision	Description
R1, juin 2022	Version 2, révision 1 <ul style="list-style-type: none">Mise à jour de la version 2 pour la conformité à l'IVDRSection pour les Substances interférentes, la Contamination croisée et la Compatibilité avec les applications en aval ajoutée

Pour connaître les dernières informations sur les licences et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Marques commerciales : 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 ou ses filiales). Les noms déposés, marques commerciales, etc. cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, tous droits réservés.

Cette page est intentionnellement laissée vierge

