

Mode d'emploi (caractéristiques de performances) du QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit

Version 2



Pour utilisation diagnostique in vitro

Pour une utilisation avec le QIAamp DSP Circulating NA Kit



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Allemagne

R1

Les caractéristiques de performances sont disponibles sous forme électronique et se trouvent sous l'onglet Resource (Ressources) de la page du produit, à l'adresse www.qiagen.com.

Introduction générale

Le QIAamp DSP Circulating NA Kit est un système faisant appel à une technologie à base de membranes de silice (la technologie QIAamp) pour isoler et purifier l'ADN et l'ARN libres circulants à partir d'échantillons de plasma sanguin humain.

Ce produit est destiné à l'usage des professionnels, tels que les techniciens et les médecins formés aux techniques de la biologie moléculaire.

Le QIAamp DSP Circulating NA Kit est conçu pour une utilisation diagnostique in vitro.

Rendement d'acides nucléiques purifiés (AN)

Le rendement d'acides nucléiques purifiés peut varier considérablement entre les échantillons de plasma. Les utilisateurs doivent donc optimiser la quantité de plasma et le volume d'élution en fonction de leur cible spécifique et de l'application en aval du laboratoire.

Si l'utilisation du kit est associée à une application en aval QIAGEN®, consulter les instructions du manuel correspondant.

Analyse des applications en aval

Les acides nucléiques isolés avec le QIAamp DSP Circulating NA Kit sont prêts pour une utilisation dans différentes applications en aval. Pour l'évaluation des performances, les acides nucléiques ont été isolés à partir de plasma sanguin humain provenant de donneurs uniques à l'aide de trois types de tubes de prélèvement sanguin différents (BD Vacutainer® K2EDTA Tube, Becton Dickinson and Company ; PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX GmbH et Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®, Streck ; $n = 24$ donneurs chacun). Les éluats obtenus à partir de 1 ml de plasma ont été testés à l'aide de la PCR quantitative (qPCR, Figure 1A) et de la PCR numérique (digital droplet PCR, ddPCR, Figure 1B), ainsi que de la RT-qPCR (transcription inverse qPCR) pour l'ARN (uniquement pour le plasma prélevé dans le BD Vacutainer K2EDTA Tube, Figure 2).

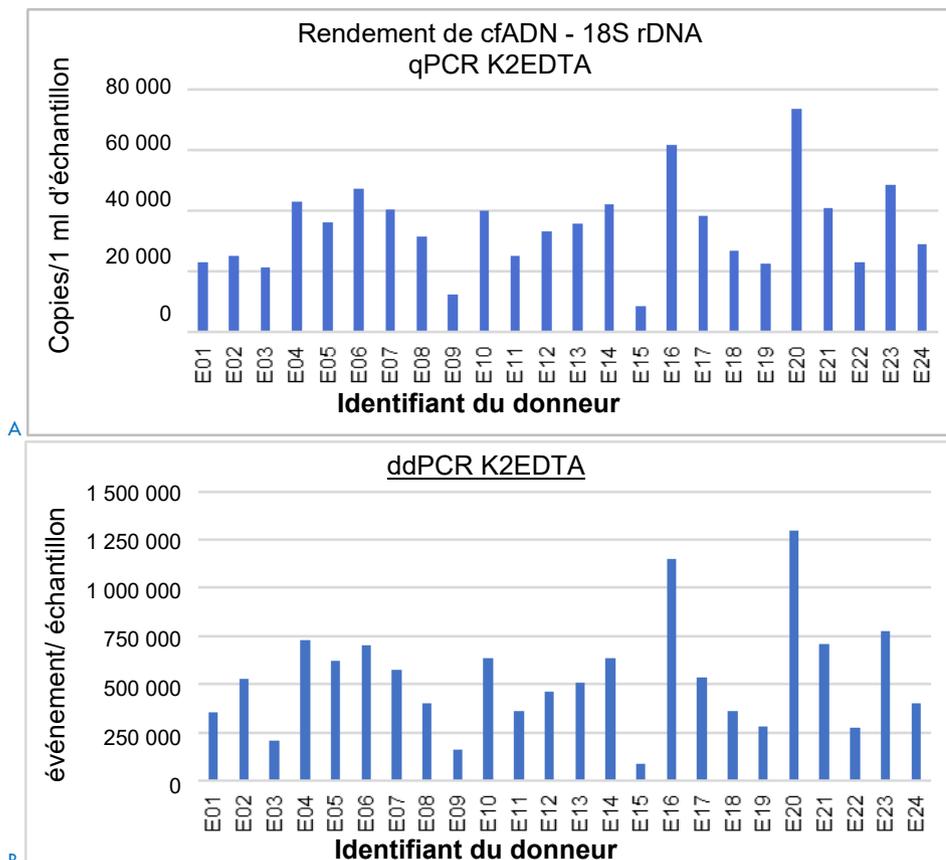


Figure 1. Comparaison entre les résultats de la qPCR et de la ddPCR (Bio-Rad®) pour 1 ml de plasma de donneurs uniques

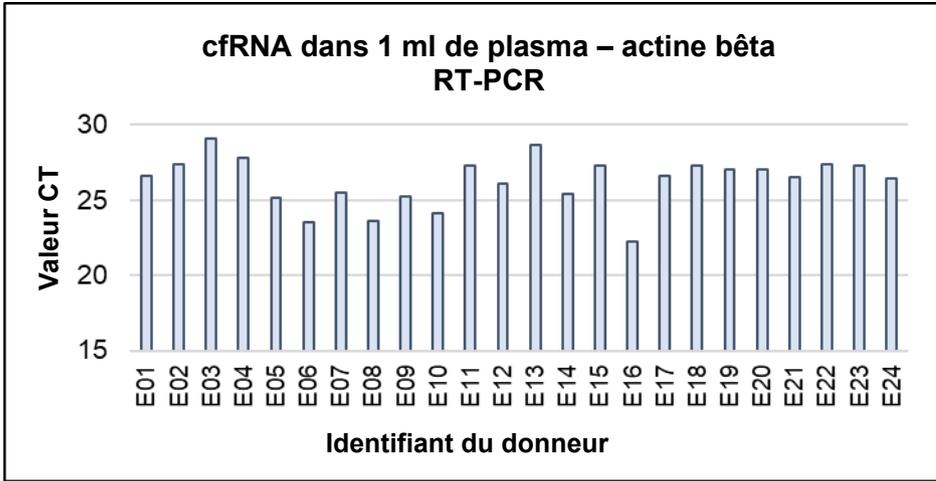


Figure 2. Détection de l'ARN libre dans 1 ml de plasma de donneurs uniques à l'aide d'un dosage de RT-qPCR pour le gène de l'actine bêta humaine (longueur de fragment de 293 pb).

Pour l'analyse par séquençage de nouvelle génération (Next-Generation Sequencing, NGS), des éluats ont été obtenus à partir de 5 ml de plasma (BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube et Streck Cell-Free DNA BCT ; $n = 8$ donneurs chacun). Le rendement d'ADN total pour 5 ml de plasma était compris entre 50 ng et 150 ng d'ADN détecté avec le dosage Qubit® HS dsDNA. L'analyse par NGS a été effectuée à l'aide du GeneRead® QIAAct Actionable Insights Tumor Panel et du système GeneReader®. Tous les échantillons ont bien été enrichis et les bibliothèques ont été créées. Plus de 98 % des lectures ont été alignées sur le génome humain et plus de 99,8 % des positions dans les régions d'intérêt présentaient une couverture $\geq 500x$.

Les technologies en aval ont pu être appliquées pour les deux types d'acides nucléiques (ADN et ARN) (Figure 3).

	qPCR	ddPCR	RT-qPCR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
PAXgene	✓	✓	non testé	✓
Streck	✓	✓	non testé	✓

Figure 3. Utilisation réussie des acides nucléiques isolés dans différentes applications en aval.

L'utilisateur doit soit optimiser la quantité de plasma et le volume d'éluat en fonction de sa molécule cible et des procédures ultérieures du laboratoire, soit se référer aux performances spécifiques de l'application en aval appropriée.

Stabilité des éluats

La stabilité des éluats dépend de la quantité et du type d'acides nucléiques isolés, du volume d'élution et des conditions de stockage. Nous recommandons aux utilisateurs de déterminer la stabilité des éluats en fonction de leurs besoins particuliers.

La stabilité des éluats a été déterminée pour l'ADN et les éluats dérivés du plasma humain obtenus avec des BD Vacutainer K2EDTA Tubes (Becton Dickinson and Company) et des tubes de prélèvement sanguin stabilisants (PAXgene Blood ccfDNA Tube et Streck Cell-Free DNA BCT). Les éluats ont été stockés entre -30 °C et -15 °C et entre -90 °C et -65 °C. Aucune détérioration n'a été constatée pendant un maximum de 12 mois. Les éluats stockés à 2–8 °C et à température ambiante (15–25 °C) étaient stables pour une durée maximale de 48 heures. Toutes les conditions ont été évaluées à l'aide d'une qPCR ciblant le gène ADNr 18S humain.

La stabilité des éluats a été déterminée pour l'ARN et les éluats dérivés du plasma humain obtenus avec des BD Vacutainer K2EDTA Tubes (Becton Dickinson and Company). Les éluats ont été stockés entre -30 °C et -15 °C et entre -90 °C et -65 °C. Aucune détérioration n'a été constatée pendant un maximum de 6 mois. Les éluats stockés à 2–8°C étaient stables pendant une durée maximale de 48 heures. Toutes les conditions ont été évaluées à l'aide d'une RT-qPCR ciblant le gène de l'actine bêta humaine.

Si l'utilisation du kit est associée à des applications QIAGEN en aval, consulter les instructions du manuel du kit correspondant.

Précision de l'isolement des AN

La précision a été déterminée à l'aide de plasma humain et les conditions ont été évaluées à l'aide d'une qPCR ciblant le gène ADNr 18S humain.

Le protocole comprenait 12 cycles de purification avec 12 réplicats chacun (soit un total de 144 purifications). Les cycles de purification ont été assurés par trois opérateurs différents sur trois jours différents, avec trois appareils différents et trois lots de QIAamp DSP Circulating NA Kit différents. L'écart type (ÉT) et le coefficient de variation (CV) ont été déterminés pour chaque paramètre et pour la variabilité globale (totale) du QIAamp DSP Circulating NA Kit (Tableau 1).

Tableau 1. Résultats de l'étude de précision

Précision			
Paramètre	Nombre de copies moyen/ml	ÉT	CV (%)
D'un cycle à l'autre		461	1,78
D'un opérateur à l'autre		1392	5,38
D'un appareil à l'autre		228	0,88
D'un jour à l'autre	25 894	2096	8,09
D'un lot à l'autre		969	3,74
Total		3120	12,05

Linéarité

Les données ont été obtenues pour un volume de 1–5 ml de plasma provenant de sang stocké dans des BD Vacutainer K2EDTA Tubes, des PAXgene Blood ccfDNA Tubes et des Streck Cell-Free DNA BCT. Une augmentation linéaire du rendement d'ADN a été observée pour tous les BCT (voir Figure 4) ; cette augmentation a également été observée pour l'ARN avec les BD Vacutainer K2EDTA Tubes.

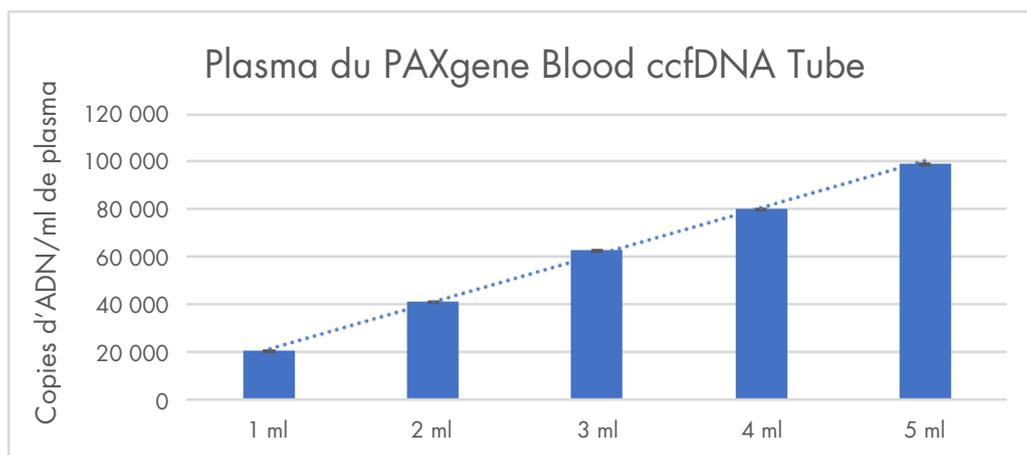


Figure 4. Augmentation linéaire du rendement d'ADN total (copies d'ADN/ml de plasma) pour différents volumes de plasma. Représentation des données obtenues avec le PAXgene Blood ccfDNA Tube ; le BD Vacutainer K2EDTA Tube (ADN/ARN) et le Streck Cell-Free DNA BCT ont produit des résultats équivalents.

Équivalence entre les protocoles breeze et classique

L'équivalence entre les performances du protocole breeze et du protocole classique a été déterminée en montrant que la limite de confiance à 95 % de la différence en valeur de Ct moyenne (ARN) ou en nombre de copies moyen/ml (ADN) était comprise dans un intervalle de $\pm 2 \times \text{ÉT}$, ÉT étant la précision observée pour le protocole classique (condition de référence). Trois lots de kit ont été utilisés et trois opérateurs ont effectué les expériences.

La précision totale (ÉT) des valeurs de Ct obtenues avec le protocole breeze était inférieure à la limite supérieure de l'intervalle de prédiction bilatéral à 95 % pour la précision totale (ÉT) du protocole classique, l'intervalle de prédiction ayant été calculé à l'aide des données du protocole classique ($n = 143$) et du nombre de points du protocole breeze ($n = 144$).

Substances interférentes

Les substances potentiellement interférentes peuvent provenir de différentes sources, par exemple, métabolites naturels, substances apportées par le traitement du patient ou substances ingérées par le patient. Pour le QIAamp DSP Circulating NA Kit, l'hémoglobine, les triglycérides, l'EDTA, la caféine, l'albumine, la bilirubine conjuguée et la bilirubine non conjuguée ont été testés en tant que composants endogènes. Il n'a été observé aucune interférence lors de l'utilisation de la qPCR comme application en aval. De plus, il n'a été observé aucune interférence due aux composants du QIAamp DSP Circulating NA Kit (protéinase K, Buffer ACL, Buffer ACB, Buffer ACW1, Buffer ACW2 et éthanol) durant le traitement des échantillons et l'extraction des acides nucléiques.

En raison de la complexité des substances potentiellement interférentes et des différences de sensibilité des applications en aval, nous recommandons aux utilisateurs d'évaluer l'effet des substances interférentes sur leur propre procédure et de valider la méthode de contrôle des interférences pour leur application en aval diagnostique spécifique.

Pour plus d'informations sur les substances interférentes dans des applications en aval QIAGEN spécifiques, consulter les manuels des kits.

Contamination croisée

Pour évaluer le niveau de contamination croisée, 105 copies de virus VHB ont été inoculées dans 5 ou 2 ml de plasma sanguin humain (échantillons positifs) et isolées à côté d'échantillons sans virus (échantillons négatifs) dans une configuration en damier en alternance avec des cycles d'extraction contenant uniquement des échantillons négatifs (afin d'évaluer la contamination croisée au sein et entre les cycles d'extraction). L'objectif de l'étude était de simuler une situation où des échantillons contenant une forte quantité d'acides nucléiques cibles peuvent entraîner la contamination croisée d'autres échantillons pendant la procédure d'extraction. La purification des AN a été réalisée à l'aide d'un lot de réactifs. La contamination croisée a été évaluée à l'aide du *artus*[®] HBV RG CE PCR Kit. Les résultats n'ont montré aucune contamination croisée dans l'ensemble du système.

Symboles



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



Fabricant

Rn

R désigne une révision du mode d'emploi (caractéristiques de performances) et n représente le numéro de révision

Historique des révisions du document

Révision	Description
R1, juin 2022	Mise à jour pour le QIAamp DSP Circulating Kit V2 conforme IVDR Ajout de l'isolation « manuelle » dans l'utilisation prévue. Aucune modification des Données de performance par rapport au kit version 1.

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®, 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 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.

06/2022 HB-3049-D01-001 © 2022 QIAGEN, tous droits réservés.

