




Caractéristiques de performances

QIAamp® DSP Circulating NA Kit, version 1 **REF** 61504

Gestion des versions

  	Vérifier la disponibilité de nouvelles versions des notices électroniques à l'adresse www.qiagen.com avec la référence du produit et dans les ressources produit avant de procéder à la réalisation des tests.
---	---

Introduction générale

Le QIAamp DSP Circulating NA Kit est un système faisant appel à une technologie à base de membranes de silice (une 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® ; PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX ; 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).

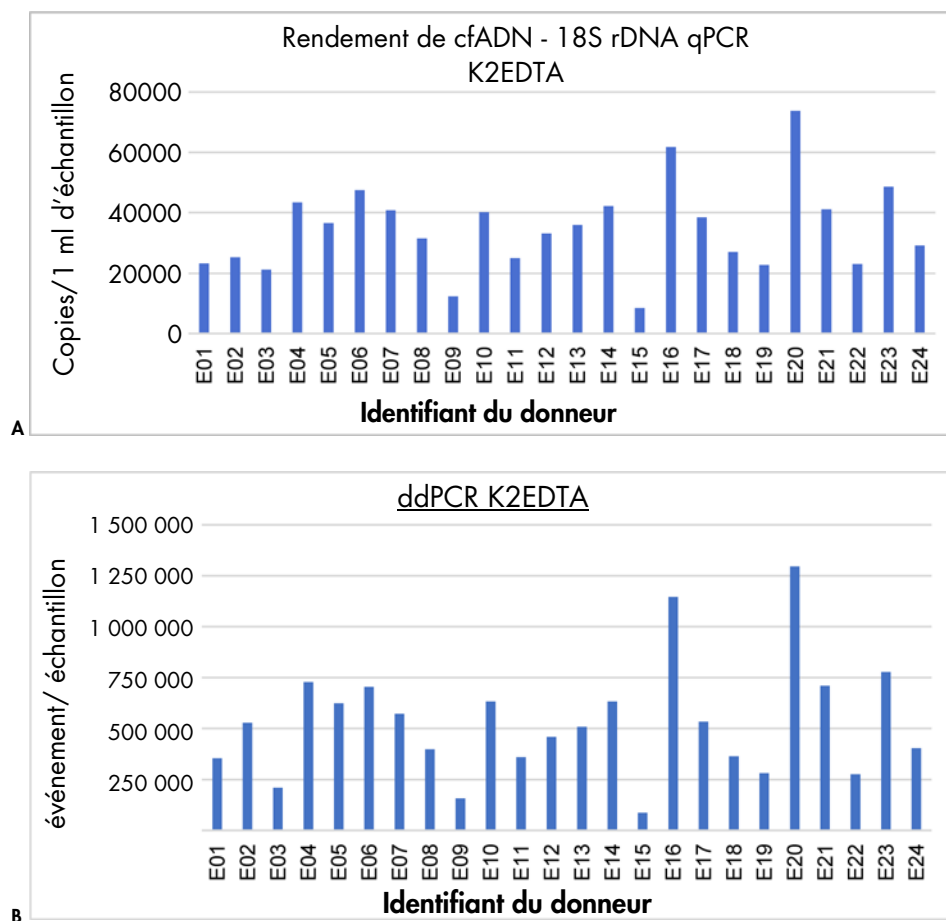


Figure 1. Comparaison entre les résultats de la qPCR et de la ddPCR (Bio-Rad®) pour 1 ml de plasma de donneurs uniques

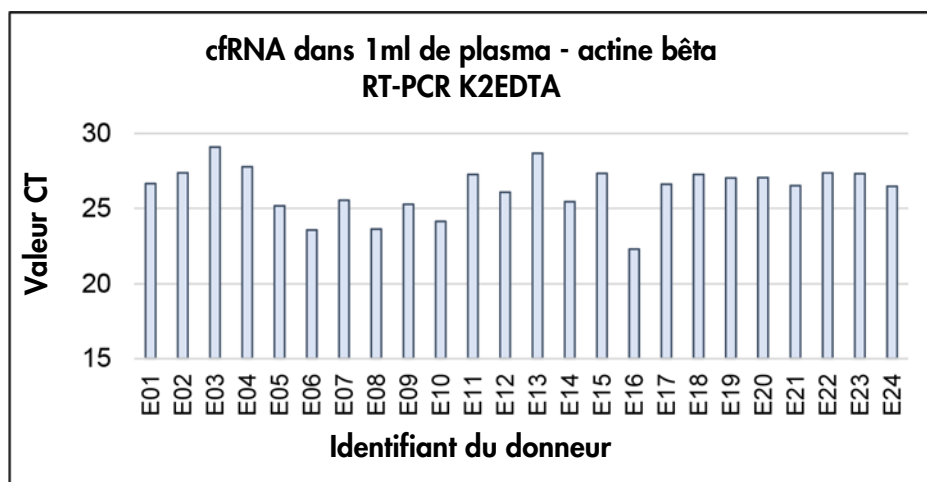


Figure 2. Détection de l'ARN libre dans 1 ml de plasma de donneurs uniques à l'aide d'un dosage de transcription inverse qPCR pour le gène de l'actine bêta humaine (longueur de fragment de 293 pb).

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 $\geq 500\times$.

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'élution 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) et des tubes de prélèvement sanguin stabilisants (PAXgene Blood ccfDNA Tube et Streck Cell-Free DNA BCT). Les éluats ont été stockés entre -30 et -15 °C et entre -90 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). Les éluats ont été stockés entre -30 et -15°C et entre -90 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 ADN α 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

Paramètre	Précision		
	Nombre de copies moyen/ml	ÉT	CV (%)
D'un cycle à l'autre	25 894	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		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.

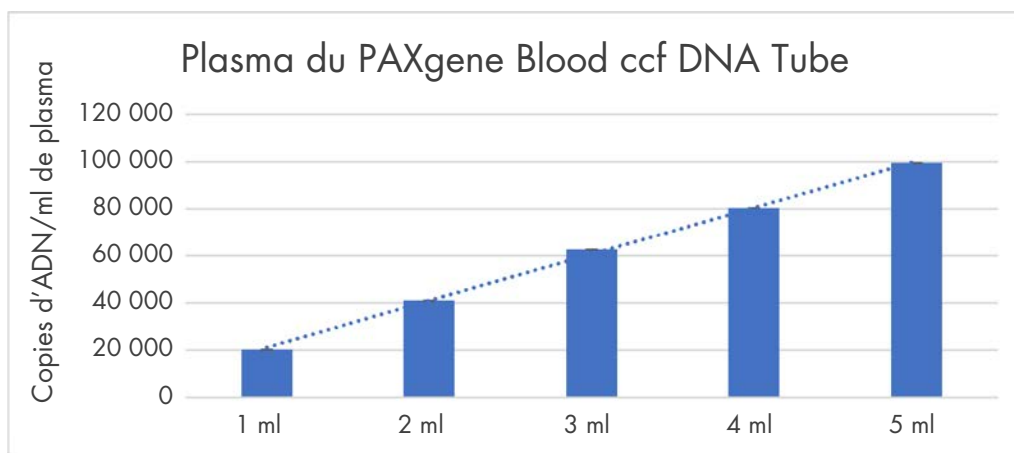


Figure 4. Augmentation linéaire du rendement d'ADN total (copies d'ADN/ml de plasma) pour différents volumes de plasma. Représentation des données obtenues avec le PAXgene Blood ccfDNA Tube ; le BD Vacutainer K2EDTA Tube (ADN/ARN) et le Streck Cell-Free DNA BCT ont produit des résultats équivalents.

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, p.ex. 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 dopées dans 5 ml 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.

Remarques

Historique des révisions

Date	Modifications
R1 09/2019	Première version
R2 08/2021	Conditions de stockage révisées pour la stabilité de l'éluat testé pour l'ADN : Un stockage de -30 à -15 °C et de -90 à -65 °C est possible pendant une durée maximale de 12 mois. Condition de stockage révisée pour la stabilité de l'éluat testée pour l'ARN : Un stockage de -30 à -15 °C et de -90 à -65 °C est possible pendant une durée maximale de 6 mois. Erreur corrigée dans la fiche de performance : Le stockage de l'ARN n'a pas été testé à température ambiante (15 à 25 °C). Données de l'étude de précision corrigées sous les colonnes SD et CV du Tableau 1.

Pour les dernières informations sur les licences et les clauses limitatives de 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™ (groupe QIAGEN) ; BD Vacutainer®, Becton Dickinson® (Becton Dickinson and Co.) ; Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.) ; PAXgene® (PreAnalytiX GmbH) ; Streck®, Cell-Free DNA BCT® (Streck Inc.) ; Qubit® (Thermo Fisher Scientific ou ses filiales).

HB-0466-D01-002 © 2021 QIAGEN, tous droits réservés.

