

Mode d'emploi (Manuel) du QIASymphony® DSP DNA Kit (caractéristiques des performances)

Version 2

IVD

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

À utiliser avec le QIASymphony DSP DNA Mini Kit et le QIASymphony DSP DNA Midi Kit.



REF

937236, 937255



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Allemagne

R1

Les caractéristiques de performance disponibles sous forme électronique peuvent être trouvées sous l'onglet ressource (ressources) de la page produit sur www.qiagen.com.

Introduction générale

Les QIASymphony DSP DNA Kits sont prévus exclusivement pour une utilisation sur QIASymphony SP.

Les QIASymphony DSP DNA Mini Kits se composent de réactifs pour purification automatisée d'ADN total provenant de sang total, de couche leuco-plaquettaire, de tissu et d'échantillons de tissu fixés au formol et inclus en paraffine (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) humains, ainsi que d'ADN viral provenant de sang total humain. Les QIASymphony DSP DNA Midi Kits se composent de réactifs pour purification automatisée d'ADN total provenant de sang total et de couche leuco-plaquettaire humains. Toutefois, les caractéristiques de performances de chaque tube de prélèvement sanguin ou type de tissu n'ont pas été établies et doivent être validées par l'utilisateur.

La technologie des particules magnétiques permet la purification d'acides nucléiques de haute qualité qui ne contiennent pas de protéines, de nucléases ni d'autres impuretés. Les acides nucléiques purifiés sont prêts à être utilisés directement dans des applications en aval, telles que les réactions d'amplification (PCR). Le QIASymphony SP réalise toutes les étapes de la procédure de purification. Un maximum de 96 échantillons, en lots contenant jusqu'à 24 échantillons, peuvent être traités au cours d'une seule analyse.

Les données de performance sélectionnées pour les différentes applications sont présentées ci-dessous.

Caractéristiques de performances

Remarque : Les caractéristiques des performances dépendent fortement de divers facteurs et sont liées à l'application spécifique en aval. Elles ont été établies pour les QIASymphony DSP DNA Mini et Midi Kits en conjonction avec des applications en aval exemplaires. Cependant, les méthodes d'isolement des acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques sont utilisées en amont de multiples applications en aval. Les paramètres de performance tels que la contamination croisée ou la précision du cycle doivent être établis pour toute procédure de ce type dans le cadre du développement de l'application en aval. Par conséquent, il incombe à l'utilisateur de valider l'ensemble de la procédure afin d'établir les paramètres de performance appropriés.

Performance de base et compatibilité avec différentes applications en aval

ADN sang et couche leuco-plaquettaire

Rendement en ADN

La performance de base de QIASymphony DSP DNA Mini Kit a été évalué en utilisant des tubes de prélèvement et des anticoagulants différents, ainsi que du sang total humain frais et congelé. Du sang total a été prélevé sur 3 donneurs sains (nombre de globules blancs [WBC] compris entre 4,0 et 11,0 x 10⁶ cellules/ml) dans 3 types de tubes différents : EDTA, 10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); citrate, 2.7 ml Sarstedt® S-Monovette® 9NC Tube 13 x 75 mm (citrate); héparine, 7,5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (héparine de lithium). Le sang utilisé était frais (stocké entre 2 et 8 °C) ou congelé (stocké à -20 °C). L'ADN génomique a été purifié à partir d'échantillons de 200 µl, avec 4 réplicats par donneur et par type de tube, en utilisant le QIASymphony DSP DNA Mini Kit et le protocole DSP Blood 200 avec un volume d'éluion de 200 µl. Les rendements et la pureté de l'ADN ont été déterminé par analyse spectroscopique (Figure 1).

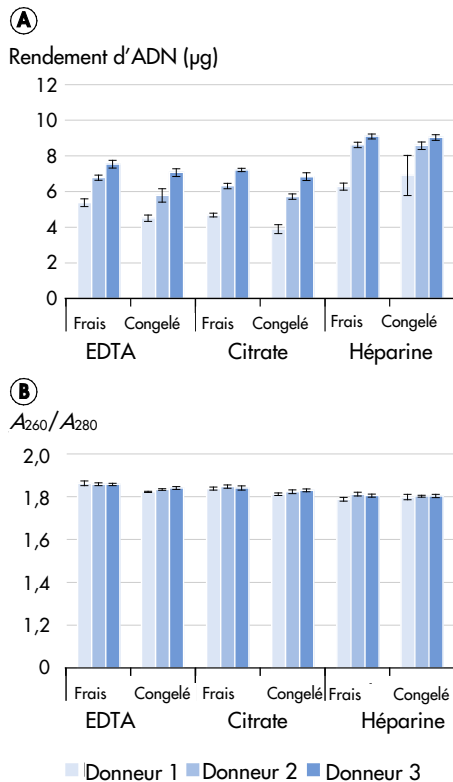


Figure 1. Rendement et pureté de l'ADN en utilisant différents tubes de prélèvement et anticoagulants avec du sang total humain frais et congelé. A Rendement d'ADN, les barres montrent le rendement absolu d'ADN avec écart type. **B** Pureté de l'ADN, les barres montrent la pureté de l'ADN avec écart type.

Intégrité de l'ADN

Les produits long-range PCR (5 kb) ont été amplifiés à l'aide d'un dosage LongRange PCR (Figure 2).

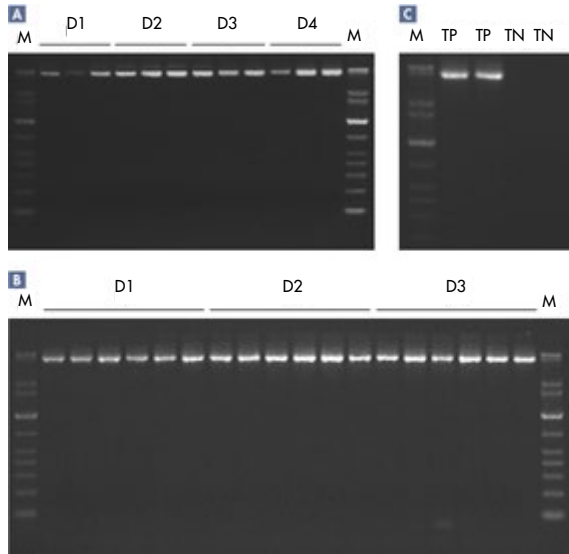


Figure 2. Test d'intégrité de l'ADN par long-range PCR. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** Le sang total a été prélevé sur 4 donneurs sains (D) dans des tubes BD K2E. L'ADN génomique pour la long-range PCR a été purifié à partir de fractions aliquotes de 200 μ l en triplicat en utilisant le QIAsymphony DSP DNA Mini Kit et le protocole DSP Blood 200 avec un volume d'élué de 200 μ l. D1, donneur 1; D2, donneur 2; D3, donneur 3; et D4, donneur 4. **B** Le sang total a été prélevé chez 3 donneurs sains dans des tubes BD K2E, et la couche leuco-plaquettaire a été préparée. L'ADN génomique a été purifié à partir de fractions aliquotes de 200 μ l en 6 réplicats en utilisant le QIAsymphony DSP DNA Mini Kit et le protocole DSP Buffy coat 200 avec un volume d'élué de 200 μ l. D1, donneur 1; D2, donneur 2 et D3, donneur 3. **C** Témoins : TP = témoin positif et TN = témoin négatif

Corrélation entre le rendement de l'ADN et la numération des WBC

Les performances de l'application QIAsymphony DSP DNA Blood et de couche leuco-plaquettaire ont été évaluées sur des échantillons de sang et de couche leuco-plaquettaire avec 6 numérations leucocytaires différentes pour chaque type d'échantillon. Pour le sang total, les numérations WBC se situent dans la plage de 4×10^6 cellules/ml à $11,6 \times 10^6$ cellules/ml et pour la couche leuco-plaquettaire, les numérations se situent dans la plage de $2,2 \times 10^7$ cellules/ml à $5,6 \times 10^7$ cellules/ml. Les rendements d'ADN ont été déterminés par analyse spectroscopique et tracés en fonction de la numération WBC (Figure 3).

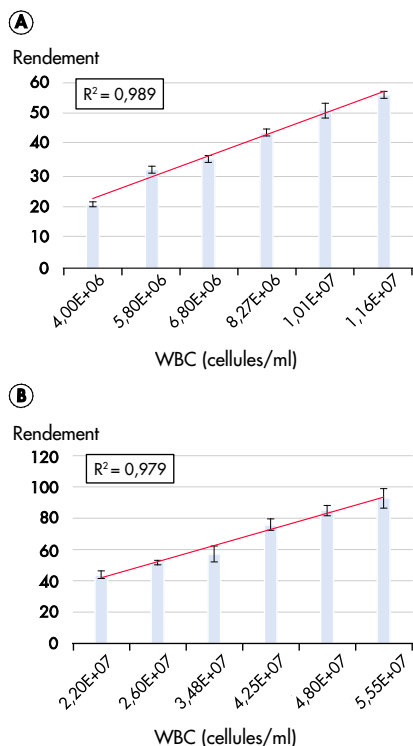


Figure 3. Corrélation entre le rendement de l'ADN et la numération des WBC. A L'ADN génomique a été purifié à partir de 1 ml de sang total humain en utilisant le QIASymphony DSP DNA Midi Kit et le protocole DSP Blood 1000 avec un volume d'éluion de 500 µl. Les barres montrent le rendement absolu d'ADN avec écart type. B L'ADN génomique a été purifié à partir de 400 µl de couche leuco-plaquettaire en utilisant le QIASymphony DSP DNA Midi Kit et le protocole DSP Buffy Coat 400 avec un volume d'éluion de 400 µl. Les barres montrent le rendement absolu d'ADN avec écart type.

Virus blood

Des études de taux de dépistage ont été réalisées en diluant un étalon pré-quantifié de l'OMS, dérivé du CMV, dans du sang total humain négatif pour le CMV. Un taux de détection de 100 % a été observé pour les échantillons ayant des charges virales de 90 UI de CMV par millilitre (Tableau 1).

Tableau 1. Sensibilité de l'application QIASymphony DSP Virus Blood

CMV (UI/ml)	Réplicats	Occurrences	Occurrence (%)
350	18	18	100,00
230	32	32	100,00
115	31	31	100,00
90	32	32	100,00
60	30	24	80,00
30	30	15	50,00
15	30	10	33,33
6	21	5	23,81
2	21	2	9,52
0	15	0	0,00

Le sang total humain a été prélevé sur 1 donneur sain négatif pour le CMV dans des tubes BD K2E, puis dopé avec un étalon de l'OMS, dérivé du CMV, en utilisant différents titres. L'ADN viral a été purifié à l'aide du QIASymphony DSP DNA Mini Kit et du protocole virus blood 200 DSP avec un volume d'éluion de 60 µl. Les éluats ont été analysés avec un dosage real-time PCR du CMV.

Tissu et tissu FFPE

Rendement en ADN

Les performances de l'application sur tissu FFPE QIASymphony DSP DNA ont été évaluées au moyen de 6 réplicats de 1–4, 10 µm de sections de tissu FFPE prélevées sur une rate humaine fraîchement coupée. L'ADN a été extrait avec le QIASymphony DSP DNA Mini Kit associé au protocole DSP à contenu faible en tissu. La déparaffinisation et la lyse ont été réalisées en appliquant la méthode de prétraitement par xylène/éthanol. L'ADN a été élué dans 50 µl de tampon d'élué, et le rendement de l'ADN a été déterminé par analyse spectroscopique (Figure 4).

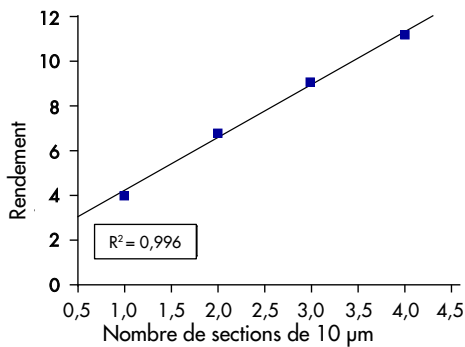


Figure 4. Corrélation entre le rendement en ADN et le nombre de coupes de tissu FFPE. Six réplicats de 1–4, 10 µm de sections de tissu FFPE de rate humaine ont été déparaffinisé par prétraitement au xylène/éthanol. L'ADN a été extrait sur le QIASymphony SP au moyen du QIASymphony DSP DNA Mini Kit associé au protocole DSP à contenu faible en tissu et à un volume d'élué de 50 µl.

Analyse du statut mutationnel des biomarqueurs par real-time PCR

L'analyse de l'état mutationnel des biomarqueurs a été réalisée à partir d'ADN extrait de sections FFPE de côlon humain et d'ADN extrait d'échantillons de tissu pulmonaire humain.

Pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons de tissu FFPE ont été prélevé 3 x 10 µm de sections de colon humain FFPE pour préparation des échantillons. L'ADN a été extrait avec de la Deparaffinization Solution pour prétraitement et selon le protocole DSP à contenu faible en tissu associé à un volume d'élué de 100 µl. L'analyse mutationnelle du biomarqueur KRAS a été réalisée à l'aide d'un dosage real-time PCR pour la détection de KRAS, conformément au manuel du dosage. Les valeurs de C_T du dosage témoin étaient dans la plage définie, et l'analyse de détection de la mutation a révélé une substitution d'acide aminé dans le codon 12 démontrée par une valeur ΔC_T de 4,17, qui est inférieure à la valeur seuil définie de 8 pour la détection d'une mutation 12SER (Tableau 2).

Tableau 2. Résultats de l'analyse mutationnelle (KRAS) à partir de tissu FFPE

Échantillon	Réaction	Valeur cible C _T	Témoin interne C _T	ΔC _T *
Témoin sans matrice	Témoin	0,00	32,75	-
	12ALA	0,00	32,65	-
	12ASP	0,00	32,69	-
	12ARG	0,00	32,86	-
	12CYS	0,00	32,35	-
	12SER	0,00	32,76	-
	12 VAL	0,00	32,41	-
	13ASP	0,00	32,26	-
Standard	Témoin	25,95	32,73	-
	12ALA	26,39	32,29	0,44
	12ASP	26,54	32,15	0,59
	12ARG	26,35	32,14	0,40
	12CYS	26,31	32,47	0,36
	12SER	26,50	32,34	0,55
	12VAL	25,80	31,92	-0,15
	13ASP	27,09	32,54	1,14
Tissu FFPE (côlon humain)	Témoin	24,94	31,98	-
	12ALA	n. d.	32,42	-
	12ASP	n. d.	32,73	-
	12ARG	n. d.	33,05	-
	12CYS	n. d.	32,74	-
	12SER	29,11	32,34	4,17
	12VAL	n. d.	32,81	-
	13ASP	n. d.	33,20	-

* $\Delta C_T = M T_T - T T_T$, où M signifie mutation et T signifie témoin; n. d., non détecté.

Pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons de tissus congelés, 25 mg de tissu pulmonaire humain ont été utilisés pour la préparation des échantillons en utilisant le protocole DSP à haute teneur en tissu et un volume d'élution de 200 µl. L'analyse mutationnelle du biomarqueur EGFR a été réalisée à l'aide d'un dosage real-time PCR pour l'EGFR. L'analyse du témoin et la détection des mutations ont été effectuées comme décrit dans le manuel de dosage. Les résultats ont révélé une délétion au sein du gène de l'EGFR, comme en témoigne une valeur ΔC_T de 2,47, inférieure à la valeur seuil définie de 12 pour la détection d'une mutation (Tableau 3).

Tableau 3. Résultats de l'analyse mutationnelle (EGFR) à partir de tissu congelé

Échantillon	Réaction	Valeur cible C _T	Témoin interne C _T	ΔC _T *
Témoin sans matrice	Témoin	0,00	31,71	-
	T790M	0,00	32,36	-
	Délétions	0,00	31,75	-
	L858R	0,00	32,05	-
	L861Q	0,00	31,77	-
	G719X	0,00	31,68	-
	S768I	0,00	32,25	-
	Ins	0,00	31,84	-
Standard	Témoin	28,78	31,05	-
	T790M	30,08	31,13	1,30
	Délétions	28,23	31,19	-0,55
	L858R	27,58	30,83	-1,20
	L861Q	27,80	30,86	-0,98
	G719X	27,80	30,90	-0,98
	S768I	29,28	31,41	0,50
	Ins	28,00	31,64	-0,78
Tissu (poumon humain)	Témoin	25,76	31,23	-
	T790M	n. d.	31,99	-
	Délétions	28,23	30,99	2,47
	L858R	n. d.	31,33	-
	L861Q	n. d.	31,98	-
	G719X	n. d.	32,06	-
	S768I	n. d.	31,88	-
	Ins	n. d.	31,62	-

* $\Delta C_T = M T_T - T T_T$, où M signifie mutation et T signifie témoin; n. d., non détecté.

Répétabilité et reproductibilité

Sang de l'ADN

L'ADN a été extrait selon le protocole DSP blood 200 avec un volume d'éluion de 200 µl. La répétabilité a été évaluée par un seul technicien qui a lancé trois cycles indépendants (96 échantillons chacun) sur trois jours différents, chaque cycle se composant de 4 lots de 24 échantillons (Tableau 4 et Tableau 5).

La reproductibilité a été évaluée en lançant 3 cycles indépendants (96 échantillons chacun) sur 3 jours différents par 3 techniciens différents sur appareils QIASymphony SP, chaque cycle se composant de 4 lots de 24 échantillons (Tableau 6 et Tableau 7).

Tableau 4. Résultats de l'évaluation de la répétabilité

Cycle	Lot	n	Rendement moyen d'ADN (µg)	É.-T.	CV
1	1	24	5,32	0,22	4,22
	2	24	4,90	0,22	4,54
	3	24	4,95	0,21	4,26
	4	24	5,05	0,18	3,60
2	1	24	5,17	0,30	5,84
	2	24	4,90	0,15	3,14
	3	24	4,82	0,20	4,13
	4	24	4,87	0,17	3,52
3	1	24	5,11	0,17	3,33
	2	24	4,84	0,24	4,91
	3	24	4,87	0,16	3,38
	4	24	4,78	0,16	3,38
Total	–	288	4,96	–	–

n, nombre de répétitions; É.-T., écart-type; CV, coefficient de variation.

Tableau 5. Données de précision pour l'évaluation de la répétabilité

	É.-T.	CV
Lot à lot au cours du même cycle	0,25	4,95
Précision globale de la répétition	0,26	5,18

É.-T. = écart type; CV = coefficient de variation.

Tableau 6. Résultats de l'évaluation de la reproductibilité

Cycle	Lot	n	Rendement moyen d'ADN (µg)	É.-T.	CV
1	1	24	5,32	0,22	4,22
	2	24	4,90	0,22	4,54
	3	24	4,95	0,21	4,26
	4	24	5,05	0,18	3,60
2	1	24	5,73	0,22	3,81
	2	24	5,56	0,26	4,63
	3	24	5,40	0,20	3,63
	4	24	5,46	0,21	3,89
3	1	24	5,73	0,26	4,62
	2	24	5,54	0,24	4,40
	3	24	5,41	0,18	3,34
	4	24	5,49	0,17	3,16
Total	–	288	5,38	–	–

n, nombre de répétitions; É.-T., écart-type; CV, coefficient de variation.

Tableau 7. Données de précision pour l'évaluation de la reproductibilité

	É.-T.	CV
Lot à lot au cours du même cycle	0,25	4,73
Précision globale de la répétition	0,38	7,03

É.-T. = écart type; CV = coefficient de variation.

Performance comparative

Sang de l'ADN

La performance du système QIASymphony DSP DNA blood a été analysé par comparaison avec le système EZ1[®] DSP DNA blood et avec la procédure de préparation manuelle du QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit. L'ADN a été purifié à partir de différents échantillons de sang, puis analysé pour le rendement en ADN (Figure 5).

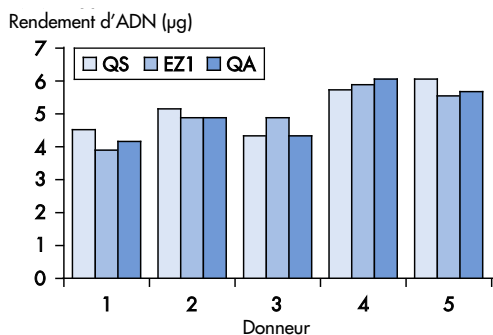


Figure 5. Comparaison des rendements d'ADN entre divers systèmes de purification d'ADN du sang. Le sang total a été prélevé sur 5 donneurs sains dans des tubes BD K2E. Dans tous les procédés, des volumes d'échantillons d'entrée de 200 µl et des volumes d'élué de 200 µl ont été utilisés. QS = QIASymphony DSP DNA Mini Kit et protocole sanguin 200 DSP; EZ1, EZ1 Advanced XL avec le EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA = QIAamp DNA Blood Mini Kit. Les barres montrent le rendement absolu d'ADN pour chaque échantillon.

Tissu et tissu FFPE

Les performances du QIASymphony DSP DNA Mini Kit ont été respectivement comparées à celle du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit manuel et au QIAamp DSP DNA Mini Kit avec du tissu FFPE et du tissu frais/congelé utilisés comme échantillons. Les préparations d'échantillons manuelles et automatiques ainsi que la quantification des rendements d'ADN ont été effectuées simultanément. Les rendements d'ADN après extraction à partir d'échantillons de tissus frais/congelés et FFPE à l'aide du QIASymphony DSP DNA Mini Kit, du QIAamp DSP DNA Mini Kit, (tissu) et du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (tissu FFPE) sont illustrés à la Figure 6.

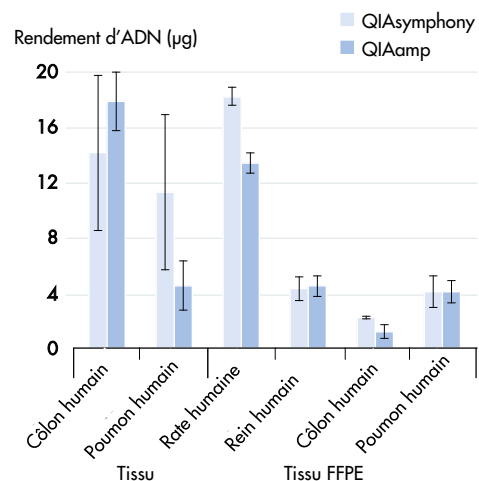


Figure 6. Extraction d'ADN à partir d'échantillons de tissu et de tissu FFPE. Pour la préparation de tissu frais/congelé, les échantillons de poumon et le colon humains ont été découpés en 6 morceaux de 25 mg. Trois morceaux de chaque type de tissu ont été utilisés pour la préparation des échantillons avec le QIASymphony SP associé au protocole DSP à contenu élevé en tissu. L'ADN a été extrait à partir des échantillons restants avec le QIAamp DSP DNA Mini Kit. L'ADN a été élué dans 200 µl et le rendement d'ADN a été déterminé par analyse spectroscopique. Pour l'extraction d'ADN à partir de tissu FFPE ont été préparé 12 réplicats de 3 x 10 µm de sections de tissu FFPE prélevées sur divers organes humains. Six échantillons ont été préparés avec le QIASymphony SP associé au prétraitement par Deparaffinization Solution et au protocole DSP à contenu faible en tissu. L'ADN a été extrait à partir des échantillons restants avec le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. L'ADN a été élué dans 50 µl et le rendement d'ADN a été déterminé par analyse spectroscopique. Les barres montrent le rendement absolu d'ADN avec écart type.

Plage d'entrée d'échantillon/de sortie d'éluat

Sang de l'ADN

Différentes plages d'entrée de l'échantillon et de sortie de l'éluat pour l'application ADN du sang ont été comparées à l'aide d'échantillons provenant de donneurs de sang dont la numération leucocytaire allait de $5,0$ à $8,0 \times 10^6$ cellules/ml.

Le sang total a été prélevé sur 8 donneurs sains dans des tubes BD K2E. L'ADN a été purifié à partir de 6 réplicats, chacun utilisant le QIAasymphony DSP DNA Mini/Midi Kit et le protocole DNA blood 200 DSP avec un volume d'éluat de $200 \mu\text{l}$, le protocole DNA blood 400 DSP avec un volume d'éluat de $400 \mu\text{l}$ et le protocole DNA blood 1000 DSP avec un volume d'éluat de $500 \mu\text{l}$ (Figure 7).

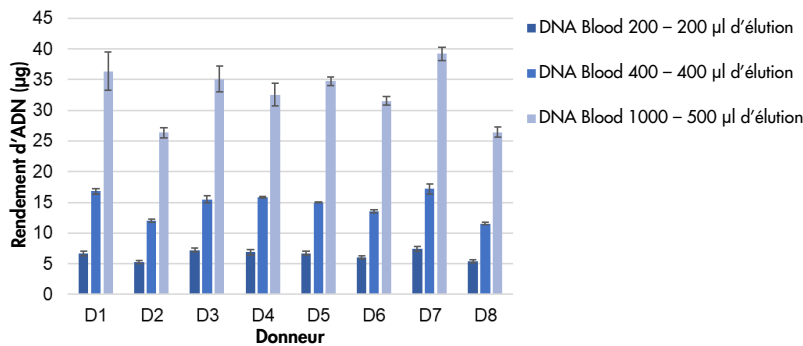


Figure 7. Comparaison de différentes entrées d'échantillons et de volumes d'éluat pour les systèmes de purification de l'ADN sanguin. Le sang total a été prélevé sur 8 donneurs sains dans des tubes BD K2E. L'extraction de l'ADN a été réalisée en utilisant le protocole DNA blood 200 avec un volume d'éluat de $200 \mu\text{l}$, le protocole DNA blood 400 avec un volume d'éluat de $400 \mu\text{l}$ et le protocole DNA blood 1000 avec un volume d'éluat de $500 \mu\text{l}$. Le rendement en ADN a été déterminé par analyse spectroscopique. Les barres indiquent le rendement absolu en ADN (valeur moyenne avec écart-type) pour chaque donneur.

Virus blood

Le sang total a été prélevé chez 3 donneurs sains, avec une numération WBC comprise entre $4,0$ et $11,0 \times 10^6$ cellules/ml, dans des tubes BD K2E et enrichi avec du matériel standard CMV (titre $3,7 \log$ copies/ml). L'ADN viral a été purifié à partir de 7 réplicats, chacune utilisant le QIAasymphony DSP DNA Mini Kit et le protocole virus blood 200 DSP avec 4 volumes d'éluat différents (Figure 8).

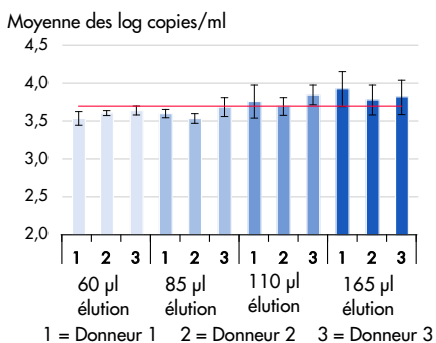


Figure 8. Comparaison de la quantification d'ADN viral pour différents volumes d'éluat. Les éluats de chaque échantillon de donneur et de chaque volume d'éluat (60 , 85 , 110 et $165 \mu\text{l}$) ont été analysés avec un dosage real-time PCR du CMV. La ligne rouge représente le titre cible et les barres montrent la moyenne des log copies par millilitre avec écart type.

Stabilité des éluats

Remarque : La stabilité de l'éluat dépend fortement de divers facteurs et est liée à l'application spécifique en aval. Elle a été établie pour le QIASymphony DSP Mini et Midi Kit en liaison avec des applications exemplaires en aval. Il incombe à l'utilisateur de consulter le mode d'emploi de l'application en aval spécifique utilisée dans son laboratoire et/ou de valider l'ensemble de la procédure pour établir des conditions de stockage appropriées.

ADN sang et couche leuco-plaquettaire

La stabilité de l'éluat pour l'application ADN sang a été testée en utilisant des éluats provenant de cycles QS réalisés avec le protocole DNA Blood 200 avec un volume d'éluat de 200 µl et avec le protocole DNA Blood 1000 avec un volume d'éluat de 500 µl. Les éluats ont été conservés dans des tubes Sarstedt de 2 ml à température ambiante, entre 2 et 8 °C, -20 °C, et -80 °C. Le rendement et la pureté de l'ADN ont été déterminés par analyse spectroscopique. L'intégrité de l'ADN a été analysée par électrophorèse sur gel et par un dosage LongRange PCR (Figure 9).

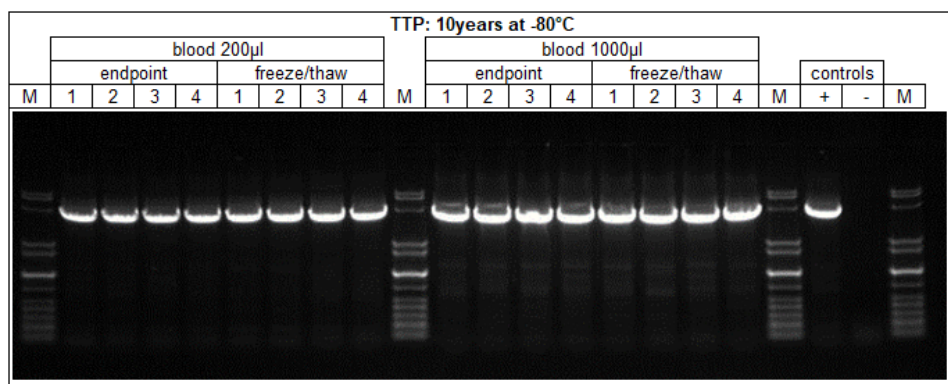


Figure 9. Stabilité de l'éluat pour le sang ADN. L'ADN a été purifié en utilisant les protocoles DNA Blood 200 µl et 1000 µl. Les éluats ont été conservés à -80 °C dans des tubes Sarstedt de 2 ml. Quatre répliquats ont été analysés. L'intégrité de l'ADN a été testée par long-range PCR. Les figures montrent les résultats après un stockage de 10 ans. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

La stabilité des éluats pour l'application de la couche leuco-plaquettaire a été testée en utilisant des éluats provenant de cycles QS réalisés avec le protocole BC 400 µl et un volume d'éluat de 200 µl. Les éluats ont été conservés dans des tubes Sarstedt de 2 ml et des portoirs de microtubes d'éluat à température ambiante, entre 2 et 8 °C, à -20 °C et à -80 °C. En outre, les éluats ont été soumis à des tests de congélation/décongélation jusqu'à 3 cycles (Figure 10). Le rendement et la pureté de l'ADN ont été déterminés par analyse spectroscopique. L'intégrité de l'ADN a été analysée par électrophorèse sur gel et par un dosage LongRange PCR (réaction de 50 µl).

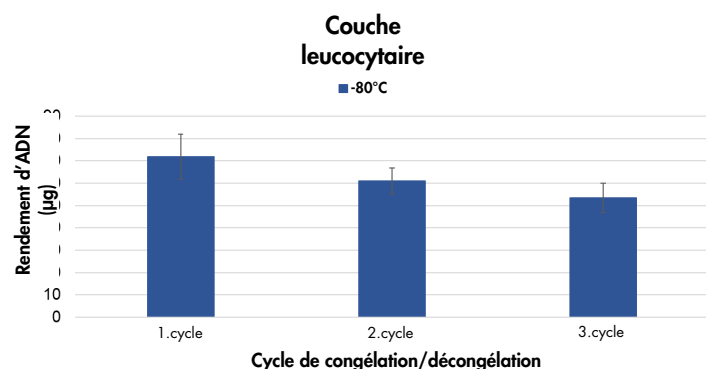


Figure 10. Cycles de congélation/décongélation de l'éluat pour la couche leuco-plaquettaire. L'ADN a été purifié en utilisant le protocole DNA BC 400 µl. La couche leuco-plaquettaire a été générée à partir de sang EDTA. Les éluats ont été conservés à ans des tubes Sarstedt de 2 ml. Le rendement de l'ADN a été déterminé aux échéances du test en utilisant le même éluat à 3 cycles de congélation/décongélation. Le rendement en ADN a été déterminé par analyse spectroscopique. Les barres indiquent le rendement absolu en ADN (valeur moyenne avec écart-type).

Virus blood

La stabilité des éluats pour l'application du sang viral a été testée en utilisant des éluats provenant de cycles QS réalisés avec le protocole Virus Blood 200 avec un volume d'éluat de 60 µl. Du sang K₂ EDTA enrichi avec un standard CMV commercial (titre 2,7 log copies/ml) a été utilisé comme échantillon. Les éluats ont été conservés dans des tubes Sarstedt de 2 ml entre 2 et 8 °C, -20 °C et -80 °C. Les éluats ont été analysés à l'aide d'un dosage en temps réel du CMV (Figure 11). Dans ce qui suit, les résultats de plusieurs échéances du test sont présentés.

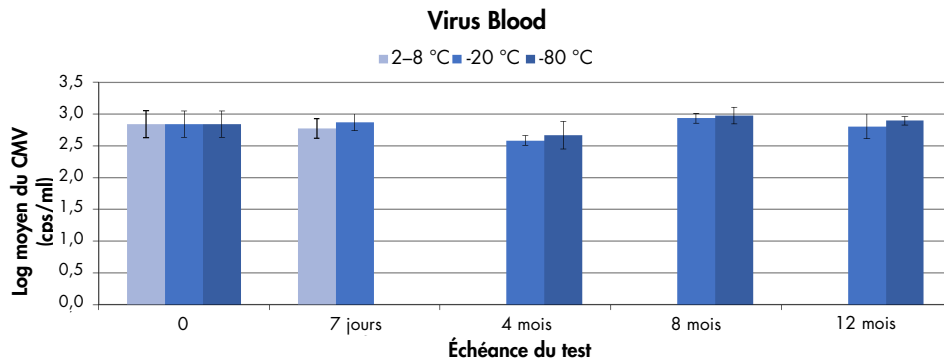


Figure 11. Stabilité de l'éluat pour l'application du sang contenant un virus. Les échantillons de sang EDTA enrichis avec un standard commercial de CMV ont été purifiés avec le protocole Virus Blood 200. Les éluats ont été conservés à plusieurs températures dans des portoirs de microtubes d'éluat et des tubes Sarstedt de 2 ml. Pour chaque échéance du test, 4 réplicats ont été analysés. Les barres indiquent le titre de CMV (valeur log moyenne avec écart type).

Tissu

La stabilité de l'éluat pour l'application tissulaire a été testée en utilisant le protocole Tissue HC 200 µl et un volume d'éluat de 200 µl. Le foie frais de bovin a été utilisé comme matériau d'échantillon. Les éluats ont été conservés dans des tubes Sarstedt de 2 ml et des portoirs de microtubes d'éluat à température ambiante, entre 2 et 8 °C, -20°C et -80 °C. Le rendement et la pureté de l'ADN ont été déterminés par analyse spectroscopique (Figure 12). L'intégrité de l'ADN a été analysée par électrophorèse sur gel.

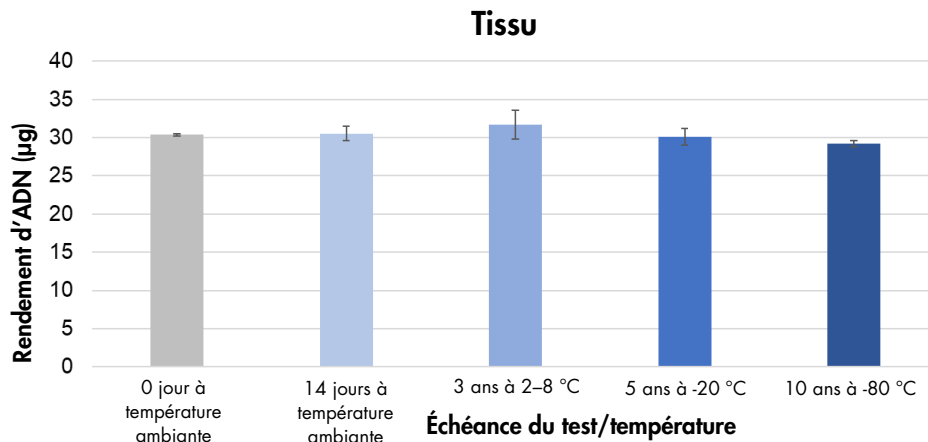
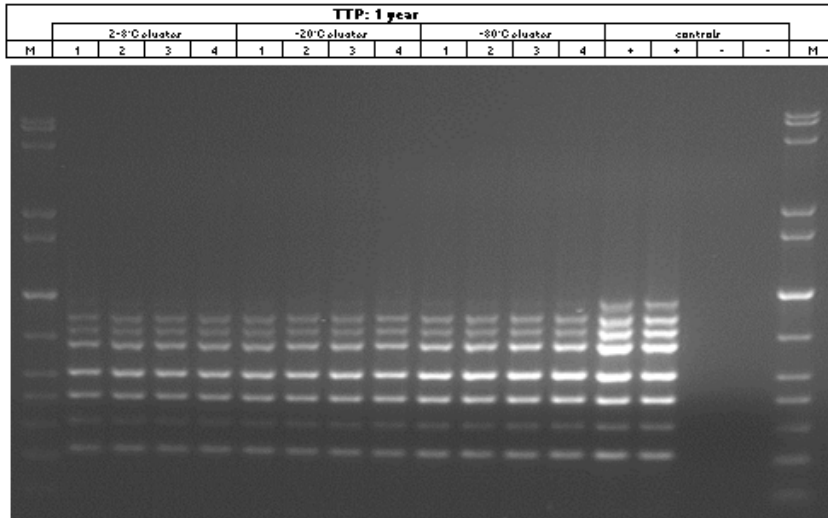


Figure 12. Stabilité de l'éluat pour les tissus. L'ADN a été purifié en utilisant le protocole DNA Tissue HC avec un volume d'éluat de 200 µl. Le foie frais de bovin a été utilisé comme matériau d'échantillon. Les éluats ont été conservés à plusieurs températures dans des portoirs de microtubes d'éluat et des tubes Sarstedt de 2 ml. Pour chaque échéance du test, 4 réplicats ont été analysés. Le rendement en ADN a été déterminé par analyse spectroscopique. Les barres indiquent le rendement absolu en ADN (valeur moyenne avec écart-type).

Tissu FFPE

La stabilité de l'éluat pour l'application des tissus FFPE a été testée en utilisant le protocole Tissue LC 200 µl et un volume d'éluat de 100 µl. Des tissus humains commerciaux FFPE ont été utilisés comme matériau d'échantillon. Les éluats ont été conservés dans des Sarstedt Tubes de 2 ml et des portoirs de microtubes d'éluat à température ambiante, entre 2 et 8 °C, -20 °C et -80 °C. Les éluats ont été analysés avec un dosage PCR 8-plex humain Inhouse (Figure 13). Dans ce qui suit, les résultats à deux échéances de test sont présentés.

A :



B :

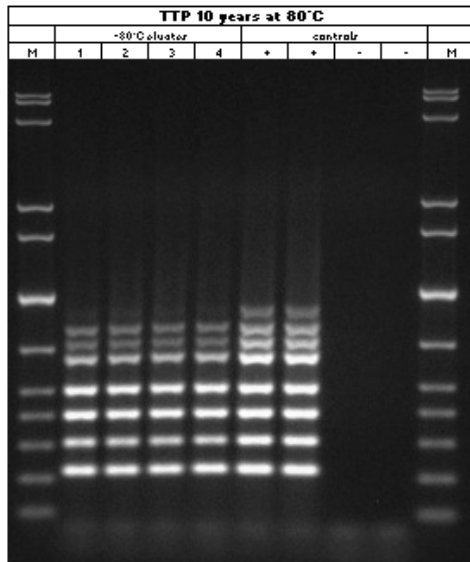


Figure 13. Stabilité de l'éluat pour les tissus FFPE. L'ADN a été purifié en utilisant le protocole DNA Tissue LC. Des tissus commerciaux FFPE ont été utilisés comme matériau d'échantillon. Les éluats ont été conservés à plusieurs températures dans des portoirs de microtubes d'éluat et des tubes Sarstedt de 2 ml. Pour chaque échéance de test, 4 réplicats ont été analysés. Les éluats ont été analysés par dosage Inhouse human 8-plex PCR.

Substances interférentes

L'influence des substances inhibitrices, qui peuvent être présentes dans le sang total, sur les performances de l'application sanguine d'ADN, de l'application sanguine de virus et de l'application tissulaire a été testée par l'ajout des substances suivantes :

Tableau 8. Substances interférentes potentielles testées pour les différentes applications

Substances interférentes	Concentration	Blood	Virus blood	Tissu
Bilirubine	200 mg/l	√	√	√
Hémoglobine	200 g/l	√	√	
Triglycérides	30 g/l	√	√	√
Protéine	120 g/l	√	√	√

Remarque : « √ » indique quels matériaux d'échantillon ont été testés pour la substance interférente potentielle respective).

Pour l'hémoglobine (200 g/l) et les protéines (120 g/l), les niveaux présents dans l'échantillon de sang ont été déterminés, puis une quantité supplémentaire d'hémoglobine ou de protéines a été respectivement ajoutée pour atteindre les concentrations indiquées de 200 ou 120 g/l. Pour la bilirubine (200 mg/l) et les triglycérides (30 g/l), la quantité totale de chaque substance a été ajoutée aux échantillons pour atteindre les concentrations indiquées.

Pour les tissus, la quantité totale de chaque substance a été ajoutée directement aux lysats, aucune détermination de la concentration en bilirubine, triglycérides ou protéines de l'échantillon de tissu utilisé n'a été effectuée.

Toute substance interférente potentielle (par exemple, des médicaments) et la concentration correspondante est très spécifique à l'application en aval et aux éventuels traitements médicaux antérieurs d'un patient et doit être examinée pendant la vérification de cette application en aval en utilisant les QIASymphony DSP DNA Mini et Midi Kits.

Remarque : Des tests ont été effectués en utilisant des applications exemplaires en aval pour une évaluation de la qualité des acides nucléiques extraits. Cependant, différentes applications en aval peuvent avoir des exigences différentes en matière de pureté (c'est-à-dire l'absence ou la concentration de substances interférentes potentielles), de sorte que l'identification et le test des substances pertinentes et des concentrations respectives doivent également être établis dans le cadre du développement de l'application en aval pour toute procédure impliquant les QIASymphony DSP Mini et Midi Kits.

Remarque : Noter qu'au cours du développement du QIASymphony DSP DNA Midi Kit, rien n'indique que l'héparine ait un impact négatif sur les performances. Toutefois, la norme ISO 20186-2:2019(E) indique que l'héparine présente dans les tubes de prélèvement sanguin peut avoir un impact sur la pureté des acides nucléiques isolés et qu'un éventuel transfert dans les éluats pourrait provoquer des inhibitions dans certaines applications en aval. Par conséquent, il incombe à l'utilisateur de vérifier si l'héparine a une influence négative sur sa procédure.

ADN sang et couche leuco-plaquettaire

Pour les applications d'ADN sanguin, les tests ont été réalisés en utilisant le protocole DSP DNA 1000, qui couvre le plus grand volume d'entrée d'échantillon, en utilisant des volumes d'éluat de 200 et 500 µl.

Les éluats ont été analysés par spectroscopie pour le rendement et la pureté de l'ADN. La compatibilité PCR a été testée en utilisant une real-time PCR ainsi qu'un dosage PCR en point final.

Aucune des substances énumérées dans le Tableau 9 n'interfère; cependant, les échantillons de sang présentant des concentrations élevées de triglycérides (> 30 g/l) peuvent dériver vers un rendement réduit en ADNg.

Virus blood

Pour l'application de sang viral, les tests ont été effectués en utilisant le protocole DSP Virus Blood 200 avec un volume d'élution de 60 µl. Les échantillons de sang négatifs pour le CMV ont été dopés avec 500 copies/ml (faible concentration) et une concentration de 1x10 E+04 copies/ml (forte concentration, Figure 14) d'un standard commercial de CMV.

Les éluats ont été analysés avec un dosage real-time PCR du CMV.

Aucune des substances énumérées dans le Tableau 9 ne présente d'interférence; toutefois, les échantillons de sang présentant des concentrations élevées de triglycérides (> 30 g/l) peuvent dériver vers une purification réduite de l'ADN viral.

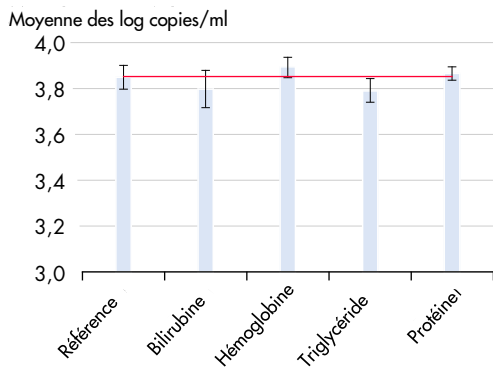


Figure 14. Test sur les substances inhibitrices. Le sang total a été prélevé sur 1 donneur sain dans des tubes BD K2E, puis dopé avec un étalon dérivé du CMV (titre de 4,0 log copies/ml). Cinq échantillons ont été testés en ajoutant des inhibiteurs potentiels, et l'ADN viral a été purifié à partir de 4 réplicats de chaque échantillon à l'aide du QIASymphony DSP DNA Mini Kit et du protocole DNA Blood 200 DSP avec un volume d'élution de 165 µl. Les éluats ont été analysés avec un dosage real-time PCR du CMV. La ligne rouge représente le titre déterminé pour les échantillons de référence, qui n'ont pas été dopés avec une substance inhibitrice quelconque et les barres montrent la moyenne des log copies par millilitre avec écart type.

Tissu

Pour les tissus d'ADN (frais et congelés), les tests ont été réalisés en utilisant le protocole DSP DNA HC, avec un volume d'élution de 200 µl.

Les éluats ont été analysés par spectroscopie pour le rendement et la pureté de l'ADN. La compatibilité avec la PCR a été testée à l'aide d'un dosage par real-time PCR.

Aucune des substances énumérées dans le Tableau 9 n'a été identifiée comme ayant un impact négatif sur la préparation de l'échantillon.

Tissu FFPE

Pour les tissus FFPE, les tests ont été réalisés en utilisant le protocole DSP DNA LC, avec un volume d'élution de 50 µl.

Les substances (voir le Tableau 9) ont été ajoutées directement au lysat.

Tableau 9. Substances interférentes potentielles testées pour les différentes applications

Substances interférentes	Concentration dans le lysat
Xylène	Jusqu'à 11 %
Éthanol	Jusqu'à 11 %
Solution de déparaffinage	Jusqu'à 11 %
Paraffine	0,1 µM coupe

Les éluats ont été analysés par spectroscopie pour le rendement et la pureté de l'ADN. La compatibilité de la PCR a été testée en utilisant une real-time PCR ainsi qu'un dosage Inhouse human 8-plex PCR.

Aucune des substances énumérées dans le Tableau 9 n'a été identifiée comme ayant un impact négatif sur la préparation de l'échantillon.

Contamination croisée





Sang de l'ADN

Le risque de contamination croisée de l'application QIASymphony DNA Blood a été analysé en effectuant quatre cycles de 96 échantillons sur l'instrument QIASymphony SP avec des lots en damier alternés (échantillons positifs et négatifs alternés), interrompus par des lots complètement négatifs. Du sang masculin (contenant une numération leucocytaire de $\geq 1,0 \times 10^7$ cellules/ml) et du sang féminin contenant une numération leucocytaire comprise entre $4,0 \times 10^6$ et 9×10^6 cellules/ml) a été utilisé comme système modèle. La préparation des échantillons a été effectuée en utilisant le protocole sang 1000 µl, qui couvre le plus grand volume d'échantillon. Une contamination potentielle des échantillons féminins négatifs pendant les cycles d'extraction a été évaluée par une analyse ultérieure des éluats en utilisant une real-time PCR pour le chromosome Y.

Aucune contamination croisée n'a été détectée d'un échantillon à l'autre, d'un lot à l'autre ou d'un cycle à l'autre.

Symboles

Les symboles suivants apparaissent dans ce document. Pour une liste complète des symboles utilisés dans le mode d'emploi ou sur l'emballage et l'étiquetage, se reporter au manuel.

Symbole	Définition du symbole
	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
Rn	R désigne une révision du mode d'emploi et n représente le numéro de révision
	Fabricant

Historique des révisions

Révision	Description
R1, juin 2022	<p>Version 2, révision 1</p> <ul style="list-style-type: none">• Mise à jour de la version 2 pour la conformité au RDIV• Ajout de sections pour les substances interférentes, la contamination croisée, la stabilité de l'éluat et la compatibilité avec les applications en aval.

Pour obtenir des renseignements actualisés et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consultez le manuel de la trousse ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des trousse et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles sur www.qiagen.com ou peuvent être demandés aux services techniques QIAGEN ou au distributeur local.

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). Les marques déposées, marques de commerce et autres marques citées dans ce document doivent être considérées comme protégées par la loi, même si elles ne sont pas spécifiquement signalées comme telles.

06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN, tous droits réservés.

