

Mode d'emploi de QIASymphony® DSP Circulating DNA Kit (caractéristiques de performances)

Version 2



Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro
À utiliser avec QIASymphony DSP Circulating DNA Kit



937556



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 sur www.qiagen.com.

Présentation 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 (circulating cell-free DNA, ccfDNA) à partir de plasma et d'urine humains.

La trousse QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit est destinée à être utilisée uniquement en combinaison avec l'instrument QIAAsymphony SP.

QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit fournit des réactifs pour la purification simultanée et entièrement automatisée de du ccfDNA à partir d'une large gamme de types de plasma humain (avec stabilisateurs de profil ccfDNA, par exemple Cell-Free DNA BCT® de Streck®, ainsi que sans stabilisateurs de profil ccfDNA, par exemple des tubes EDTA) et d'urine humaine (avec et sans stabilisateurs de profil de ccfDNA). Les caractéristiques de performance de chaque tube de prélèvement sanguin n'ont pas été établies, elles doivent être validées par l'utilisateur.

Le ccfDNA purifié est compatible avec une large gamme d'applications en aval, telles que les chimies PCR, les dosages de quantification par fluorescence ou les NGS.

Le QIAAsymphony SP effectue toutes les étapes de la procédure de purification. Vous pouvez traiter jusqu'à 96 échantillons, par lots de 24, en une même analyse. Il se peut que les échantillons d'urine nécessitent un prétraitement manuel.

Remarque : Les caractéristiques de performances dépendent fortement de divers facteurs et sont liées à l'application spécifique en aval. Elles ont été établies pour QS DSP Circulating DNA Kit en conjonction avec des applications exemplaires en aval. Cependant, les méthodes d'isolement des acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques sont utilisées en amont de multiples applications en aval, et les paramètres de performance, par exemple la contamination croisée et 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.

Performances de base

Les performances de base de QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit ont été évaluées sur 48 donneurs uniques pour l'extraction de ccfDNA à partir de 4 ml de plasma Streck et de 4 ml d'urine stabilisée. Le rendement en ccfDNA a été déterminé avec un dosage real-time PCR interne pour la séquence codante de l'ARN ribosomal 18S.

La différence de rendement (\log_{10} copies/ml) sur la Figure 1 (4 ml de plasma) et la Figure 2 (4 ml d'urine) reflète les fortes concentrations de ccfDNA dépendant du donneur que l'on trouve généralement dans le même volume de l'échantillon respectif.

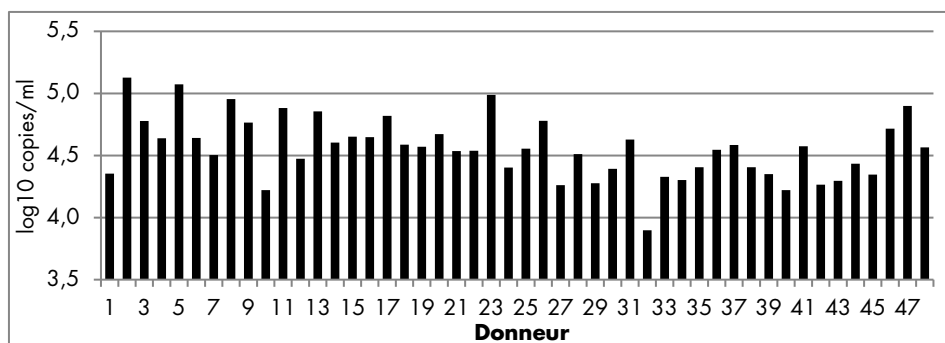


Figure 1. Le rendement en ccfDNA du plasma de 48 donneurs uniques. Le don de sang de 48 donneurs uniques a été effectué dans du Cell-Free DNA BCT (Streck). Le ccfDNA a été extrait de 4 ml de plasma à l'aide de QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit. Le rendement en ccfDNA a été quantifié en utilisant un dosage de real-time PCR interne pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en copies cibles par millilitre d'entrée de plasma.

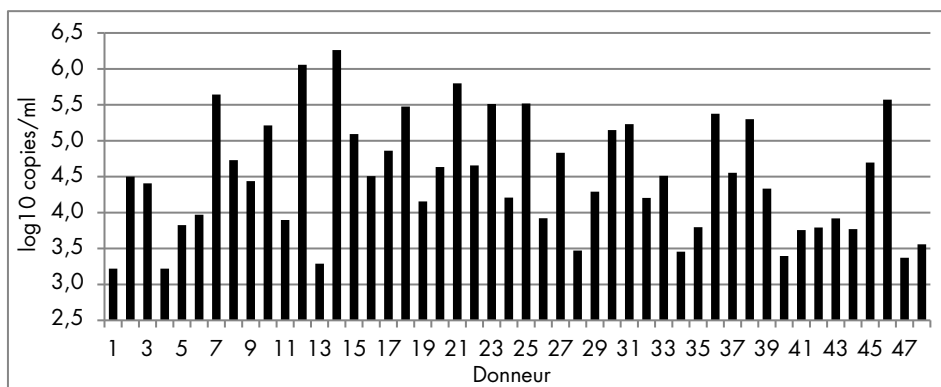


Figure 2. Le rendement en cfDNA de l'urine de 48 donneurs uniques. L'urine recueillie auprès de 48 donneurs uniques a été stabilisée à l'aide de Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck). Le cfDNA a été extrait de 4 ml d'urine à l'aide de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. Le rendement en cfDNA a été quantifié en utilisant un dosage de real-time PCR interne pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en copies cibles par millilitre d'urine.

Précision du cycle

Les coefficients de variation (CV) ont été déterminés pour l'extraction de cfDNA humain à partir de plasma EDTA. Pour l'analyse de précision, le cfDNA a été quantifié à l'aide d'un dosage real-time PCR interne pour la séquence codante du ribosome 18S. Au total, 10 cycles QIASymphony ont été réalisés, chacun en 4 lots (8 répliquats par lot). Les données de précision sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1. Analyse des estimations de la précision

Précision	CV (%)
Au sein d'un lot	11,67
Répétabilité	13,14
Précision intermédiaire	13,14
Précision totale	14,12

Performances équivalentes des protocoles de 2 et 4 ml

Les performances équivalentes des protocoles pour des échantillons de 2 et 4 ml ont été évaluées pour QIASymphony DSP Circulating DNA Kit en utilisant du cfDNA endogène extrait d'un pool de plasma EDTA humain. Au total, 8 cycles indépendants QIASymphony ont été réalisés, chacun en 4 lots avec 8 répliquats par lot. La gamme linéaire de la procédure de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit a été déterminée pour la séquence codante 18S avec un dosage de real-time PCR interne (Figure 3). Le rapport de différence pour les protocoles de 2 et 4 ml est montré dans le tableau 2 (Le protocole de référence est une entrée d'échantillon de 4 ml).

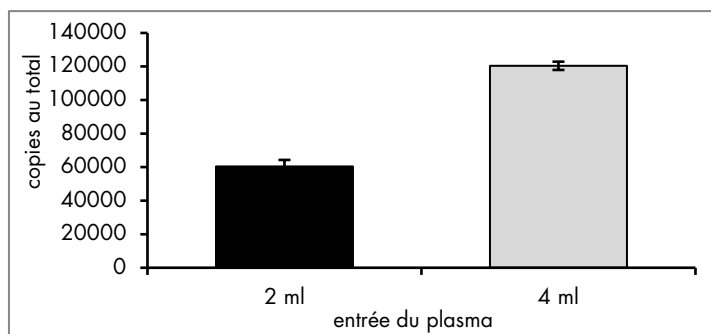


Figure 3. Performance équivalente en utilisant le protocole d'entrée des échantillons de 2 et 4 ml. La gamme linéaire du protocole cfDNA a été déterminée en utilisant les protocoles de 2 et 4 ml. Le rendement en cfDNA a été quantifié en utilisant un dosage interne de real-time PCR pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en nombre total de copies par protocole.

Tableau 2. Différence entre les protocoles de 2 et 4 ml (N = 256)

Paramètre	Valeur
Rapport estimé de la moyenne géométrique des copies calculées/ml	1,01
Limite inférieure de confiance à 95 %	0,92
Limite supérieure de confiance à 95 %	1,11
Précision totale	14,12

Les performances des protocoles pour des échantillons de 2 et 4 ml sont équivalentes, mesurées en copies calculées par millilitre.

Distribution des tailles

Pour évaluer la distribution de taille des échantillons, le ccfDNA d'un échantillon de 4 ml a été extrait à l'aide de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, élué dans 75 µl, puis 1 µl d'éluat a été soumis à une analyse de taille avec le bioanalyseur Agilent® 2100 en utilisant une puce à ADN haute sensibilité Agilent. Un total de 5 répétitions indépendantes a été effectué. Un profil d'ADN représentatif est présenté pour le plasma dans la Figure 4 et pour l'urine dans la Figure 5.

L'électrophérogramme du plasma de la Figure 4 montre le pic fréquemment observé à environ 165 pb, allant de 145 à 196 pb, ce qui correspond à la longueur de l'ADN lié aux histones dans le nucléosome. L'électrophérogramme pour l'urine de la Figure 5 montre que le pic prédominant à environ 160 pb est plus large, allant d'environ 145 à 250 pb. En outre, pour l'urine, un second pic allant d'environ 20 à 100 pb (au niveau du pic du marqueur inférieur) est présent, indiquant une fraction de ccfDNA avec un degré de fragmentation plus élevé. De plus, la Figure 5 montre un nombre élevé de longs fragments d'ADN d'environ 2 kb. Une forte abondance de ces fragments d'ADN génomique est souvent trouvée dans les échantillons d'urine, très probablement en raison de la libération d'ADN génomique par les cellules présentes dans l'urine.

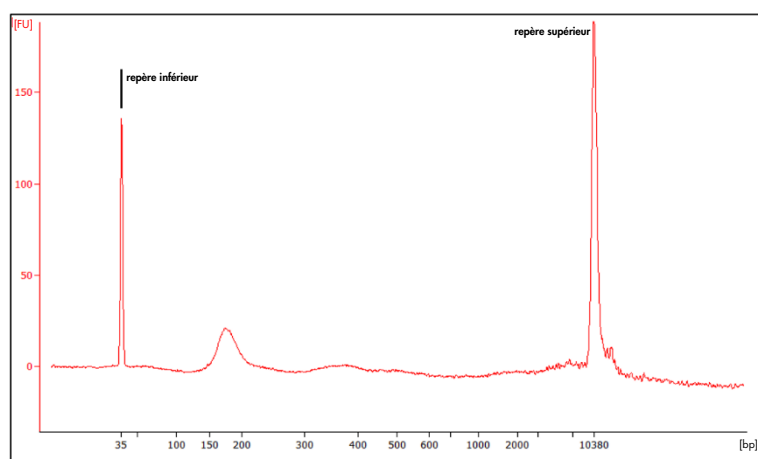


Figure 4. Distribution de taille de ccfDNA à partir du plasma (profil du bioanalyseur). Le ccfDNA a été extrait de 4 ml de plasma EDTA à l'aide de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 µl d'éluat a été soumis à une analyse par puce à ADN Agilent haute sensibilité. Axe x : taille des paires de bases (bp); axe y : unités de fluorescence (FU).

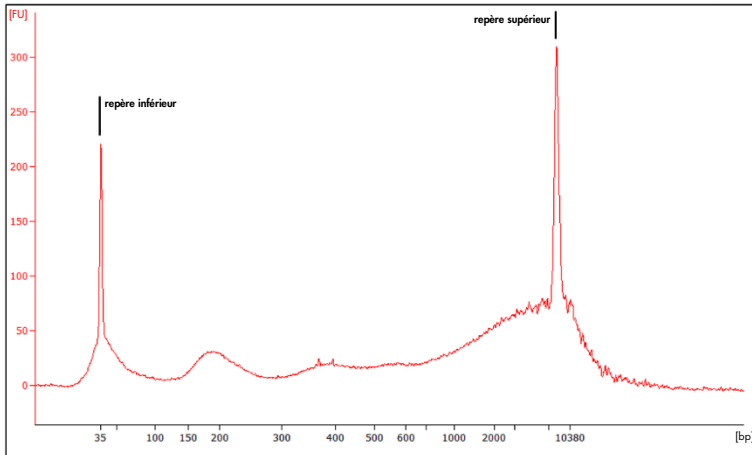


Figure 5. Distribution de taille du ccfDNA provenant de l'urine (profil du bioanalyseur). Le ccfDNA a été extrait de 4 ml d'urine l'aide de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 µl d'éluat a été soumis à une analyse par puce à ADN Agilent haute sensibilité. Axe x : taille des paires de bases (bp); axe y : unités de fluorescence (FU).

Stabilité de l'éluat

La stabilité de l'éluat de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit a été évaluée à l'aide de ccfDNA extrait d'un pool de plasma EDTA humain. Les éluats ont été stockés dans 2 formats de portoirs d'éluat différents : QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; n° de réf. 19588) et tubes Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock de 1,5 ml. Les éluats ont été analysés en réplicats de 8. La stabilité de l'ADN dans les éluats a été déterminée par un dosage interne de real-time PCR pour la séquence codante de l'ARN ribosomal 18S.

La stabilité de l'éluat de 2–8 °C n'a pas été affectée par la durée de la période de stockage jusqu'à un mois, ni par le format de stockage (Figure 6). La stabilité de l'ADN dans les tubes LoBind n'a pas été affectée par un stockage entre -15 °C et -30 °C comprenant 3 cycles de gel-dégel après 7 jours, un mois et deux mois (Figure 7).

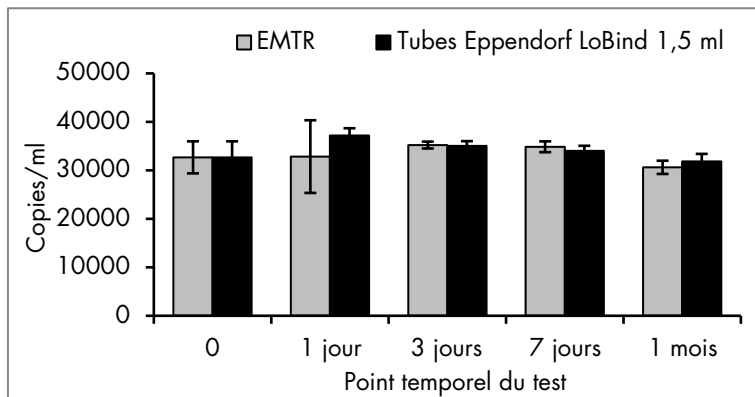


Figure 6. Stabilité du ccfDNA dans les éluats stockés de 2–8 °C dans 2 formats de tubes. Le ccfDNA a été extrait du plasma EDTA à l'aide de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit et conservé de 2–8 °C pour les différents points de test. Le rendement en ccfDNA a du ccfDNA été quantifié en utilisant un dosage de real-time PCR interne pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en copies cibles par millilitre d'entrée de plasma.

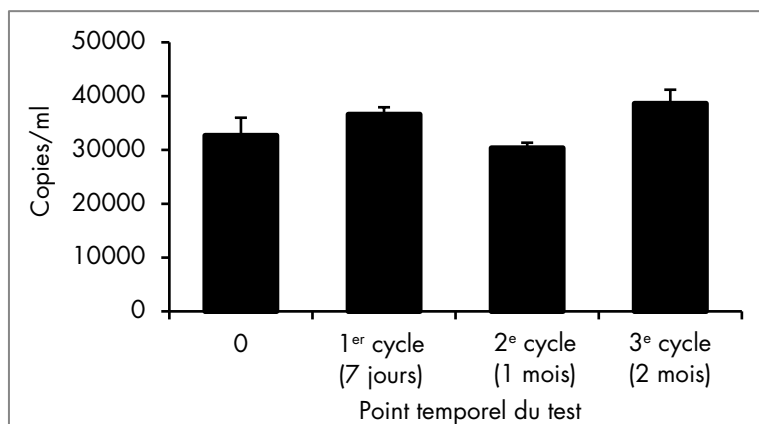


Figure 7. Stabilité du ccfDNA dans les éluats stockés entre -15°C et -30°C, y compris 3 cycles de congélation-décongélation. Le ccfDNA a été extrait du plasma EDTA à l'aide de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit et conservé entre -15 °C et -30 °C dans des tubes Eppendorf LoBind de 1,5 ml. Le rendement en ccfDNA a été déterminé à 3 moments du test en utilisant le même éluat à 3 cycles de congélation-décongélation. Le rendement en ccfDNA a été quantifié en utilisant un dosage de real-time PCR interne pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en copies cibles par millilitre d'entrée de plasma.

Substances interférentes

Du plasma et de l'urine humains ont été enrichis de différentes substances interférentes potentielles (voir tableau 3) afin de tester leur impact sur la performance d'extraction du ccfDNA de QS DSP Circulating DNA Kit et leur compatibilité ultérieure avec des essais effectués en aval. Les éluats ont été analysés avec une real-time PCR interne pour la séquence codante 18S et avec le Fluoromètre Qubit® en utilisant un dosage dsDNA de 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 gammaglobine	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

[†] FDA Draft Guidance (11.05.2011)

Aucune des substances énumérées dans le tableau 3 ne présente d'interférence, à l'exception des échantillons de plasma présentant de fortes concentrations de gamma-globuline (> 30 g/litre) qui peuvent entraîner une récupération réduite de l'ADN libre circulant.

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 de substances interférentes potentielles), de sorte que l'identification et le test des substances pertinentes doivent également être établis dans le cadre du développement de l'application en aval pour toute procédure impliquant QIASymphony 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 alternés (échantillons positifs et négatifs alternés). Du plasma féminin (échantillon négatif) et du plasma féminin enrichi avec du gDNA masculin coupé d'une concentration de $1,0E+05$ copies du gène SRY1 par millilitre de plasma (échantillon positif) ont été utilisés comme matériaux d'échantillonnage pour un système modèle. La préparation des échantillons a été effectuée en utilisant le protocole de 4 ml qui comprend deux transferts séparés d'échantillons de chaque volume de 2 ml. Une contamination potentielle des échantillons de plasma féminin négatifs pendant les cycles d'extraction a été évaluée par une analyse ultérieure des éluats à l'aide d'une real-time PCR pour le gène SRY1 spécifique du chromosome Y.

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

Compatibilité avec différentes applications en aval

Des exemples d'applications en aval ont été utilisés au cours du développement de QIASymphony DSP Circulating DNA Kit pour démontrer que les acides nucléiques isolés sont compatibles avec un large éventail de technologies d'application en aval, notamment la real-time PCR (voir Figure 1, Figure 2, Figure 3, Figure 6 et Figure 7), le fluoromètre Qubit (dosage des protéines et dosage de l'ADNdb à haute sensibilité), la bibliothèque (voir Figure 8) et le séquençage de nouvelle génération (Next Generation Sequencing, NGS).

L'électrophérogramme de la Figure 8 montre un exemple de ligature réussie de l'adaptateur et d'amplification ultérieure du ccfDNA. À côté du pic proéminent à 300 pb pour le ccfDNA nucléosomal (environ 165 plus environ 70 pb pour chaque adaptateur), le pic di-nucléosomal à environ 470 pb est également visible.

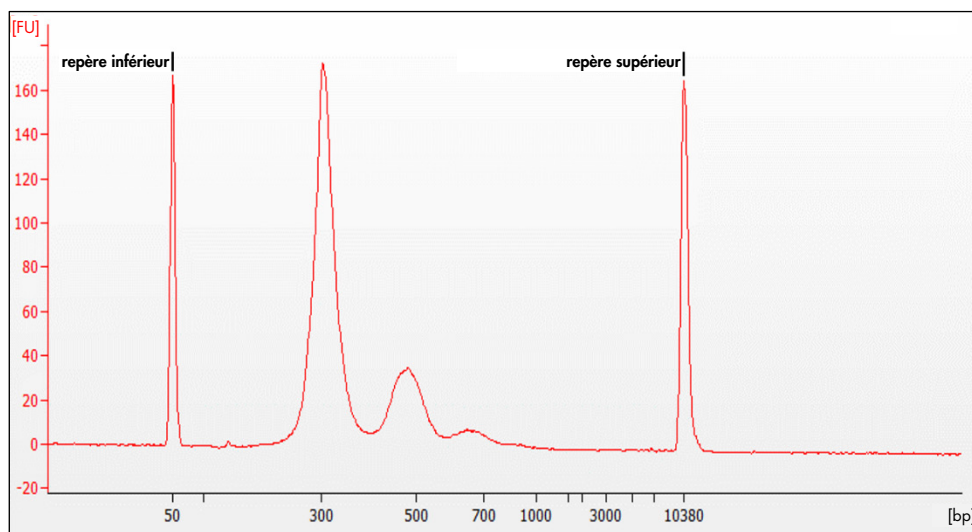

















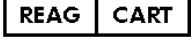
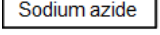


Figure 8. Bibliothèque d'ADN de ccfDNA (donneur unique) extrait avec QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. Le ccfDNA a été extrait du plasma Streck en utilisant le protocole de 4 ml, puis 35 µl d'éluat ont été transférés dans NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs). Après amplification et nettoyage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

Symboles

Les symboles suivants figurent dans le mode d'emploi ou être apposés sur l'emballage ou les étiquettes :

Symbole	Définition du symbole
	Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions
	Date limite d'utilisation
	Ce produit répond aux exigences de la réglementation européenne 2017/746 pour les 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
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 réactif)
	Cartouche de réactif
	Azoture de sodium

Symbole

Définition du symbole

EtOH

Éthanol

UDI

Identifiant unique du dispositif

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 à l'IVDR• Ajout d'une section pour les substances interférentes, la contamination croisée 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 trousses 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®(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 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.

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

Cette page est intentionnellement laissée vierge

