

Février 2017

Kit QIAasymphony[®] DSP Circulating DNA

Caractéristiques de performance

IVD

CE

MAT

937556

Contenu

Caractéristiques de performance	4
Performances de base.....	4
Précision des cycles	6
Équivalence de performance des protocoles sur volumes d'échantillon de 2 ml et de 4 ml	7
Répartition granulométrique.....	8
Stabilité de l'éluat.....	10

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

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

Le kit QIASymphony DSP Circulating DNA fournit les réactifs nécessaires à la purification entièrement automatisée et simultanée de l'ADNlc humain à partir d'une large gamme de types de plasmas humains (plasma avec traitement anticoagulant à l'EDTA ou au citrate et plasma issu de tubes de prélèvement de sang stabilisé pour l'ADNlc) et d'urines humaines (stabilisées et non stabilisées). 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. Le poste de travail QIASymphony 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.

Caractéristiques de performance

Performances de base

Les performances de base du kit QIASymphony DSP Circulating DNA ont été évaluées pour l'extraction de l'ADNlc à partir de 4 ml de plasma stabilisé ainsi que de 4 ml de plasma sur EDTA et de 4 ml d'urine stabilisée provenant de 48 dons unitaires. Le rendement en ADNlc a été déterminé par PCR maison en temps réel 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 stabilisé), à la figure 2 (4 ml de plasma sur EDTA) et à la figure 3 (4 ml d'urine stabilisée) reflètent l'importante dépendance vis-à-vis du donneur des concentrations en ADNlc habituelle pour le même volume dans les différents échantillons. Les rendements en ADNlc du plasma stabilisé et du plasma sur EDTA pour les 48 dons unitaires montrent une forte corrélation lors de l'utilisation de plasma issu de ces deux types différents de tubes de prélèvements sanguins (Figure 1 et Figure 2).

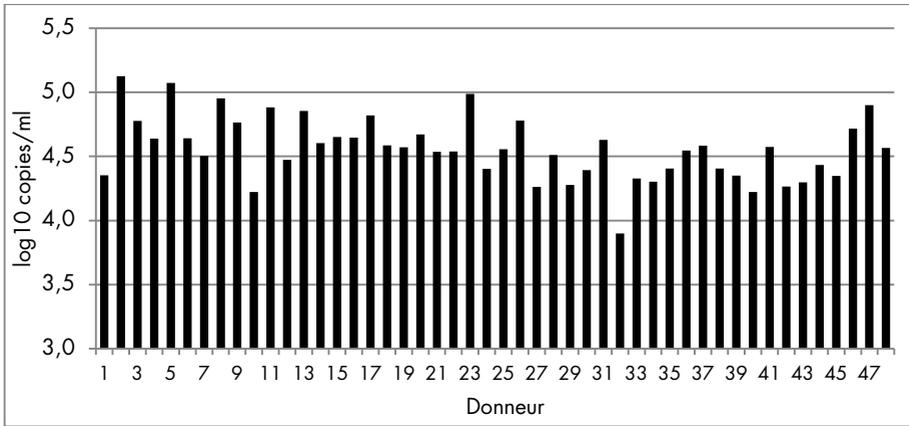


Figure 1 Rendement en ADNlc de 48 dons unitaires de plasma : tubes de prélèvement de sang stabilisé pour l'ADNlc. Les 48 dons unitaires de sang ont été prélevés dans des tubes de prélèvement de sang stabilisé pour l'ADNlc. L'ADNlc a été extrait de 4 ml de plasma en utilisant le kit QIAAsymphony DSP Circulating DNA, et le rendement en ADNlc a été quantifié par PCR maison en temps réel pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en nombre de copies cibles par ml de volume de plasma.

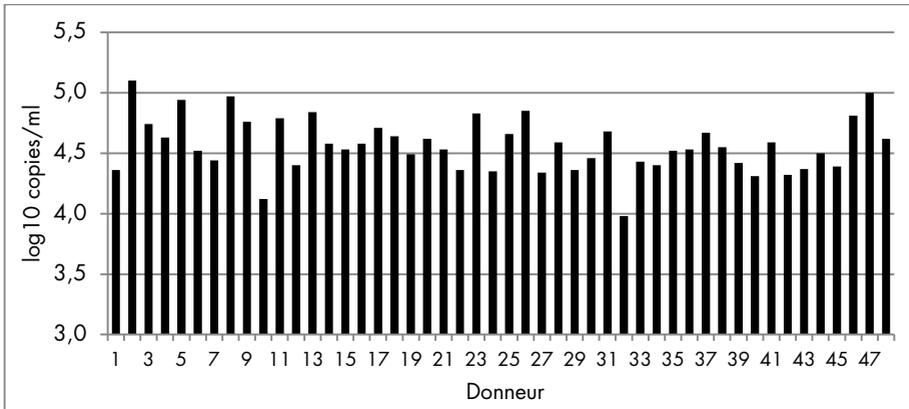


Figure 2 Rendement en ADNlc de 48 dons unitaires de plasma : tubes de prélèvement de sang sur EDTA. Les 48 dons unitaires de sang ont été prélevés dans des tubes de prélèvement de sang sur EDTA. L'ADNlc a été extrait de 4 ml de plasma en utilisant le kit QIAAsymphony DSP Circulating DNA, et le rendement en ADNlc a été quantifié par PCR maison en temps réel pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en nombre de copies cibles par ml de volume de plasma.

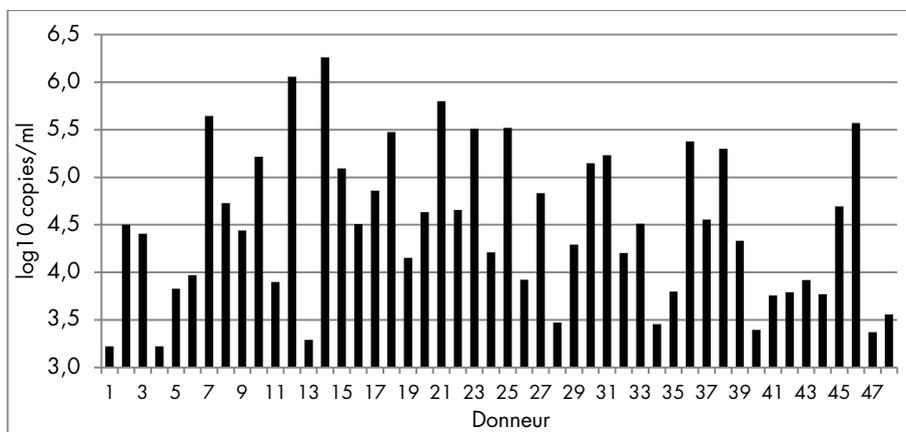


Figure 3 Rendement en ADNIc de 48 dons unitaires d'urine stabilisée. Les 48 dons unitaires d'urine ont été stabilisés immédiatement après recueil. L'ADNIc a été extrait de 4 ml d'urine en utilisant le kit QIAasymphony DSP Circulating DNA, et le rendement en ADNIc a été quantifié par PCR maison en temps réel pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en nombre de copies cibles par ml de volume d'urine.

Précision des cycles

Les coefficients de variation (CV) ont été déterminés pour l'extraction de l'ADNIc humain à partir de plasma sur EDTA. Pour l'analyse de précision, l'ADNIc a été quantifié par PCR maison en temps réel pour la séquence codante ribosomique 18S. Au total, 10 cycles QIAasymphony 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 (%)
Au sein du lot	11,67
Répétabilité	13,14
Précision intermédiaire	13,14

Précision	CV (%)
Précision totale	14,12

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

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

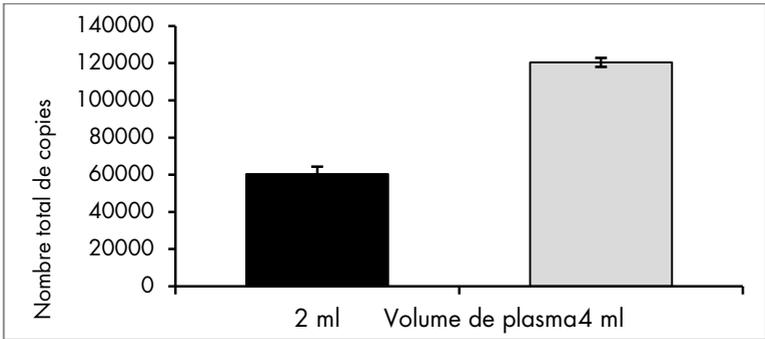


Figure 4 Équivalence de performance des protocoles sur volumes d'échantillon de 2 ml et de 4 ml. La plage linéaire du protocole de quantification de l'ADNlc a été déterminée pour les protocoles sur volumes d'échantillon de 2 ml et de 4 ml. Le rendement en ADNlc a été quantifié en utilisant une PCR maison en temps réel 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 ml et de 4 ml (N = 256)

Paramètre	Valeur
Rapport estimé des moyennes géométriques, en nombre de copies/ml calculé	1,01
Limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 %	0,92
Limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95 %	1,11

La performance des protocoles sur volumes d'échantillon de 2 ml et de 4 ml, mesurée en nombre de copies/ml 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 kit QIAAsymphony DSP Circulating DNA, 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 5 pour le plasma et en figure 6 pour l'urine stabilisée.

L'électrophorégramme du plasma présenté à la figure 5 illustre le pic fréquemment observé aux alentours de 160 bp, avec une valeur comprise entre 145 bp 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 6 montre que le pic prédominant aux alentours de 160 bp est plus large, avec une plage comprise entre environ 145 bp et 250 bp. En outre, un second pic compris entre environ 20 bp 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 6 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.

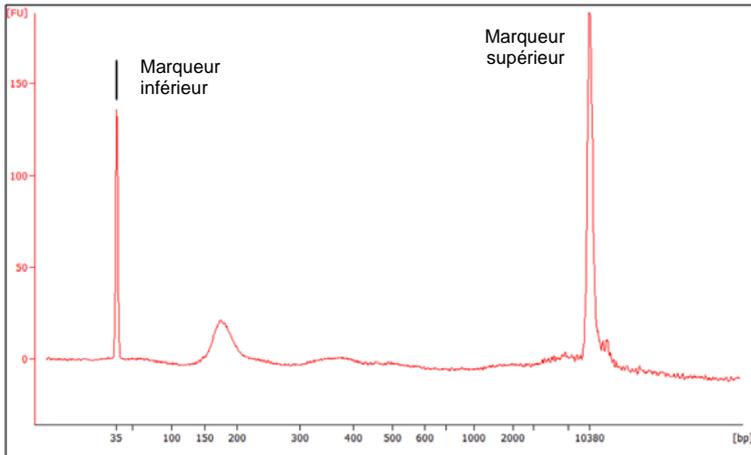


Figure 5 Répartition granulométrique de l'ADNc issu du plasma (profil de bioanalyseur). L'ADNc a été extrait de 4 ml de plasma sur EDTA en utilisant le kit QIA Symphony DSP Circulating DNA ; 1 μ l d'éluat a été soumis à une analyse sur puce à ADN à haute sensibilité d'Agilent. Axe des abscisses : taille en paires de base (bp) ; axe des ordonnées : unités de fluorescence (FU).

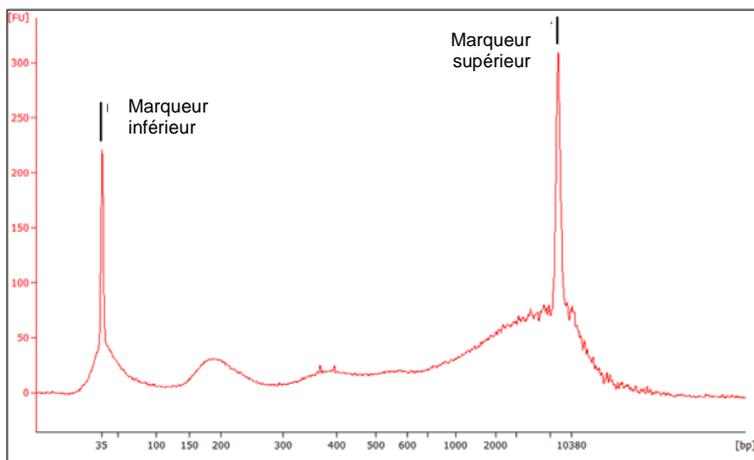


Figure 6 Répartition granulométrique de l'ADNlc issu de l'urine (profil de bioanalyseur). L'ADNlc a été extrait de 4 ml d'urine stabilisée en utilisant le kit QIAasymphony DSP Circulating DNA ; 1 µl d'éluat a été soumis à une analyse sur puce à ADN à haute sensibilité d'Agilent. Axe des abscisses : taille en paires de base (bp) ; axe des ordonnées : unités de fluorescence (FU).

Stabilité de l'éluat

La stabilité de l'éluat a été évaluée pour le kit QIAasymphony DSP Circulating DNA 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] ; référence 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 PCR maison en temps réel 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 7). La conservation à une température comprise entre -15 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 8).

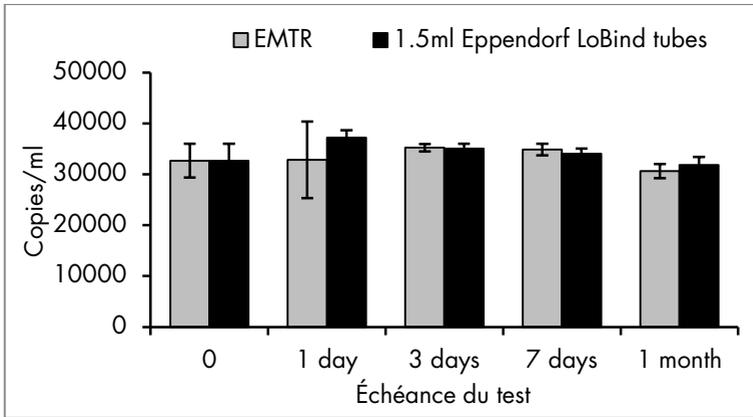


Figure 7 Stabilité de l'ADNIc dans les éluats stockés à une température comprise entre 2 et 8 °C dans 2 formats de tube. L'ADNIc a été extrait à partir de plasma sur EDTA en utilisant le kit QIAAsymphony DSP Circulating DNA, puis stocké à une température comprise entre 2 et 8 °C avec différentes échéances de test. Le rendement en ADNIc a été quantifié en utilisant une PCR maison en temps réel pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en nombre de copies cibles par ml de volume de plasma.

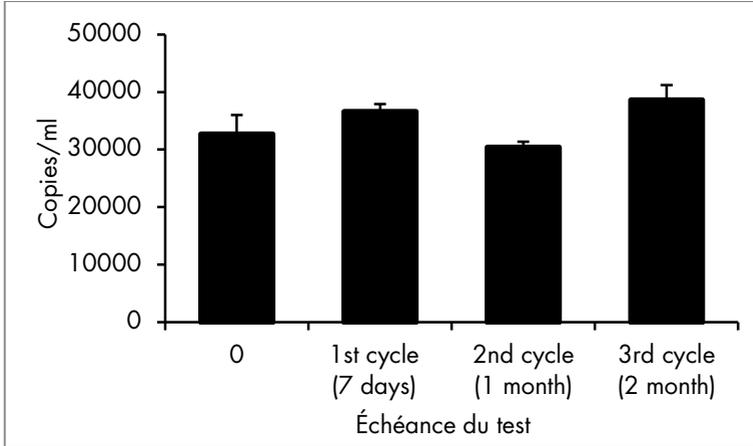


Figure 8 Stabilité de l'ADNIc dans les éluats stockés à une température comprise entre -15 et -30 °C avec 3 cycles congélation-décongélation. L'ADNIc a été extrait à partir de plasma sur EDTA en utilisant le kit QIAAsymphony DSP Circulating DNA, puis stocké à une température comprise entre -15 et -30 °C dans des tubes LoBind d'Eppendorf de 1,5 ml. Le rendement en ADNIc a été déterminé à 3 échéances de test en utilisant le même éluat au bout des 3 cycles congélation-décongélation. Le rendement en ADNIc a été

quantifié en utilisant une PCR maison en temps réel pour la séquence codante 18S. Les résultats ont été calculés en nombre de copies cibles par ml de volume de plasma.

Pour obtenir les dernières informations sur la licence et les clauses de responsabilité spécifiques des produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN approprié. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse **www.qiagen.com** ou peuvent être demandés auprès des QIAGEN Technical Services ou du distributeur local.

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (Groupe QIAGEN) ; Eppendorf® (Eppendorf AG).
Les noms déposés, les marques de commerce, etc., cités dans le présent document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

02/2017 HB-2309-D01-001
© 2017 QIAGEN, tous droits réservés.

