

Avril 2021

Instrument QIASymphony[®] SP – Mode d'emploi (Fiche de protocole)

Pour le coffret PreAnalytiX QIASymphony PAXgene[®]
Blood ccfDNA (CE-IVD) et le PreAnalytiX PAXgene
Blood ccfDNA Tube (CE-IVD; **CE**₀₁₂₃)

Protocoles PAXgene Blood ccfDNA IVD :

PAXcircDNA_2400, PAXcircDNA_4800, PAXcircDNA_PrimaryTube_2400 et PAXcircDNA_PrimaryTube_4000

Informations générales

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Le coffret QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA (CE-IVD), pour utilisation avec l'instrument QIASymphony SP, est destiné à l'isolation et la purification automatisées de l'ADN acellulaire circulant (ccfDNA) issu du plasma généré à partir de sang total veineux humain prélevé dans le PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD).

La procédure de purification est optimisée pour une utilisation avec du plasma généré à partir de sang total veineux humain prélevé dans les tubes PAXgene Blood ccfDNA (CE-IVD). Pour obtenir des instructions sur la procédure de prélèvement du sang, consultez le mode d'emploi du PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) sur la page d'accueil du produit (www.PreAnalytiX.com).

Quatre différents protocoles ont été établis pour l'isolation automatisée du ccfDNA dans le plasma généré à partir de sang total veineux humain prélevé dans les tubes PAXgene Blood ccfDNA (CE-IVD). Dans les versions classiques, des volumes d'échantillonnage initiaux de 2,4 ou 4,8 ml de plasma peuvent être sélectionnés. En outre, les protocoles de manipulation des tubes primaires autorisent le placement direct du PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) à bord de l'instrument QIASymphony SP. Les protocoles de manipulation des tubes primaires sont disponibles pour des volumes d'échantillonnage initiaux de 2,4 ou 4,0 ml de plasma (voir les tableaux en pages suivantes).

Chaque volume de plasma utilisé pour l'extraction de ccfDNA requiert le volume d'échantillonnage initial correspondant, notamment le volume mort et le script de protocole correspondant comme résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Informations générales relatives à l'utilisation du coffret QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA (CE-IVD)

Matériel d'échantillonnage	Plasma humain généré à partir de sang total veineux dans les tubes PAXgene Blood ccfDNA (CE-IVD)			
Kit	Coffret QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA (CE-IVD), 192, N° de réf. 768566			
Version du logiciel	Version 5.0 ou ultérieure			
Protocoles	Ligne de protocole	Volume d'échantillonnage initial (dont volume mort) (ml)	Volume d'échantillonnage utilisé pour l'extraction de ccfDNA (ml)	(Assay Control_) Nom du protocole
	Standard	2,8	2,4	(ACS_) PAXcircDNA_2400
		5,3	4,8	(ACS_) PAXcircDNA_4800
	Manipulation des tubes primaires	selon l'outil de sélection	2,4	(ACS_) PAXcircDNA PrimaryTube_2400
			4,0	(ACS_) PAXcircDNA PrimaryTube_4000

La préparation du plasma peut s'effectuer à l'aide (A) du protocole de double-centrifugation standard ou (B) via la manipulation des tubes primaires : traitement direct des tubes PAXgene Blood ccfDNA Tubes (CE-IVD) centrifugés une fois à bord de l'instrument QIASymphony SP.

A) Préparation du plasma sanguin pour les protocoles standard

1. Centrifugez le PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) à température ambiante (15–25 °C) pendant 15 minutes à 1 600–3 000 × g en utilisant une centrifugeuse à rotor libre calibrée. Si une décélération est privilégiée, il est recommandé d'utiliser une décélération moyenne et validée pour votre flux de travail spécifique.

Remarque : Pour une performance optimale des échantillons réfrigérés avant la centrifugation, laissez les tubes revenir à température ambiante avant de les utiliser.

2. Pipetez le plasma dans un tube pour centrifugeuse à fond conique de 15 ml (non fourni), en veillant à ne pas perturber la fraction cellulaire nucléée.
3. Centrifugez le tube pour centrifugeuse à fond conique de 15 ml pendant 10 minutes à température ambiante (15–25 °C) à 1 600–3 000 × g en utilisant une centrifugeuse calibrée.
Remarque : Ne dépassez pas la vitesse de centrifugation maximale recommandée par le fabricant du tube secondaire.
4. Pipetez le volume de plasma requis (voir section « Volume d'échantillon » à la page 5) dans un tube en polystyrène à fond rond de 14 ml, 17 x 100 mm, en veillant à ne pas perturber le culot de cellules sanguines résiduel, le cas échéant.
5. Transférez le tube à fond rond avec l'échantillon de plasma sur le porte-tubes et chargez le porte-tubes dans le tiroir d'échantillon de l'instrument QIASymphony SP.

Remarque : Pour récolter le maximum de ccfDNA, traitez le volume maximal de plasma disponible.

Remarque : Évitez la formation de mousse dans ou sur les échantillons de plasma. La présence de mousse ou de bulles d'air sur les échantillons peut entraîner le pipetage d'un volume incorrect d'échantillon.

Remarque : Après le prélèvement du sang et la centrifugation, le plasma peut être conservé entre 2 et 8 °C pendant une durée maximale de 7 jours. Pour les conserver plus longtemps nous recommandons de congeler les aliquotes.

Remarque : En cas d'utilisation d'échantillons de plasma préalablement conservés (par ex. conservés entre 2 et 8 °C ou congelés à –20 °C ou –70 °C/–80 °C), ces derniers doivent être équilibrés à température ambiante (15–25 °C) avant l'exécution.

B) Préparation du plasma sanguin pour la manipulation des tubes à bord de l'instrument QIASymphony SP

1. Centrifugez le PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) à température ambiante (15–25 °C) pendant 15 min à 3 000 × g en utilisant une centrifugeuse à rotor libre calibrée. Si une décélération est privilégiée, il est recommandé d'utiliser une décélération moyenne et validée pour votre flux de travail spécifique.

Remarque : Pour une performance optimale des échantillons réfrigérés avant la centrifugation, laissez les tubes revenir à température ambiante avant de les utiliser.

- Quantifiez le volume de plasma dans chaque tube après leur retrait du rotor de la centrifugeuse grâce au PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool fourni dans le coffret (Figure 1). Une fois le tube retiré de la centrifugeuse, la flèche bleue sur l'outil est alignée avec l'interface plasma/cellules. Les traits bleus indiquent que le niveau de plasma est suffisant pour le protocole de manipulation des tubes primaires de 2,4 ou 4,0 ml. Une hauteur de colonne de plasma minimum de 2,3 cm est nécessaire pour le protocole de 2,4 ml et un minimum de 3,4 cm est nécessaire pour le protocole de 4,0 ml.



Déterminez le protocole optimal pour utiliser les tubes PAXgene Blood ccfDNA (CE-IVD) directement à bord de l'instrument QIASymphony SP

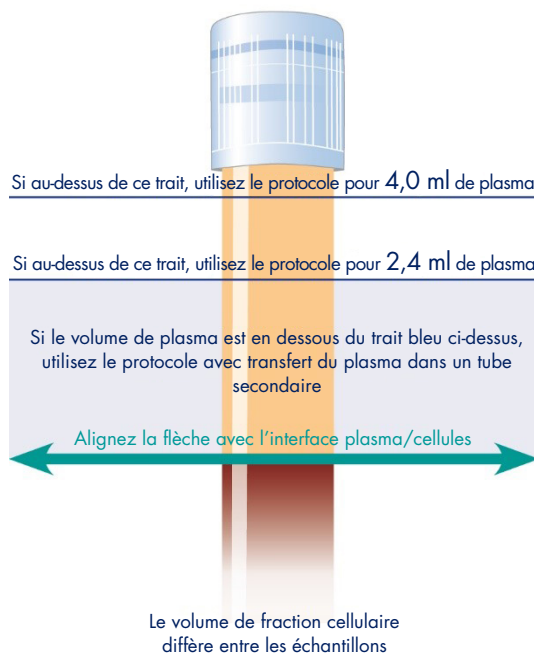


Figure 1. Détermination du volume de plasma à l'aide du PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool (Ceci est fourni à titre d'illustration uniquement ; ne l'imprimez pas car les dimensions réelles diffèrent — non adapté pour une utilisation avec des échantillons).

Remarque : Si la séparation nette du plasma et de la fraction cellulaire ne s'est pas faite ou si les phases ont été accidentellement inversées après le retrait de la centrifugeuse, la centrifugation doit être renouvelée.

- Retirez le bouchon Hemogard des tubes PAXgene Blood ccfDNA (CE-IVD) avant de placer ces derniers à bord de l'instrument QIASymphony SP pour une extraction directe du ccfDNA.
- Placez les tubes PAXgene Blood ccfDNA (CE-IVD) ouverts contenant suffisamment de plasma dans le porte-tubes et chargez le porte-tubes dans le tiroir d'échantillon de l'instrument QIASymphony SP instrument.

Volume d'échantillon

Dans les flux de travail classiques, pour veiller à ce que les échantillons de 2,4 ml (protocole PAXcircDNA_2400) et de 4,8 ml (protocole PAXcircDNA_4800) soient transférés par l'instrument, un volume mort de 0,4 ml et 0,5 ml respectivement est nécessaire, ce qui signifie qu'un échantillonnage minimum de 2,8 et 5,3 ml doit être exécuté. Dans l'éventualité de volumes de plasma inférieurs à 2,8 ou 5,3 ml, le Less Sample mode (mode Quantité moindre d'échantillon) fait partie intégrante de la fonction du protocole et permet de transférer des volumes de plasma inférieurs à ceux indiqués. Dans ce cas, moins d'échantillon est transféré par l'instrument et le volume transféré est documenté dans le fichier de résultat. En outre, les échantillons respectifs sont marqués comme indéfinis (code d'erreur 140043, Enable Less Sample mode [mode Autoriser une quantité moindre d'échantillon]). Les volumes d'échantillonnage de plasma minimum pour activer le Less Sample mode (mode Quantité moindre d'échantillon) sont de 1,6 ml (protocole PAXcircDNA 2400) et 4,1 ml (protocole PAXcircDNA 4800). Les échantillons ne seront pas traités et seront marqués comme non valides si un volume d'échantillon inférieur est fourni. Pour le flux de manipulation de tubes primaires, le volume d'échantillonnage approprié est garanti en utilisant le PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool fourni dans le coffret et décrit dans la section « B) Préparation du plasma sanguin pour la manipulation des tubes à bord de l'instrument QIASymphony SP » à la page 3.

Tiroir « Sample » (Échantillon)

Tableau 2. Informations relatives à la configuration du tiroir d'échantillon*

Type d'échantillon	Plasma humain généré à partir de sang total veineux dans les tubes PAXgene Blood ccfDNA (CE-IVD)
Volume d'échantillonnage (dont volume mort)	2,8 ml (PAXcircDNA_2400) ; 5,3 ml (PAXcircDNA_4800) Voir PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool (PAXcircDNA_PrimaryTube_2400) Voir PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool (PAXcircDNA_PrimaryTube_4000)
Tubes d'échantillonnage primaires	PAXgene Blood ccfDNA Tube 10 ml (CE-IVD) 16 x 100 mm (BD™, N° de réf. 768165)
Tubes d'échantillonnage secondaires	Tubes de 14 ml, 17 x 100 mm, en polystyrène, à fond rond (Corning®, N° de réf. 352051)
Inserts	S.O.
Autre	Protéinase K requise dans les tubes de 14 ml, 17 x 100 mm, en polystyrène, à fond rond (Corning, N° de réf. 352051) ; n'utilisez que les positions 1 et 2 du porte-tubes (pour la fente A)

* Voir aussi la liste de matériel de laboratoire disponible dans l'onglet Product Resources (Ressources produit) sur www.qiagen.com.
S.O. : sans objet.

Tubes d'échantillonnage pour porte-tubes

Tableau 3. Informations relatives à la configuration du porte-tubes*

Nom à l'écran	Fournisseur	Matériel	Exemple de N° de réf.	Insert	PAXcircDNA_2400	PAXcircDNA_4800	PAXcircDNA_PrimaryTube_2400	PAXcircDNA_PrimaryTube_4000
BD #352051 FalconPP 17 x 100	Corning†	14 ml Falcon® polystyrene round-bottom tube 17 x 100 mm	352051	Insert inutile	2,8 ml† 1,6 ml‡§ (Enable Less Sample mode [mode Autoriser une quantité moindre d'échantillon])	5,3 ml† 4,1 ml‡§ (Enable Less Sample mode [mode Autoriser une quantité moindre d'échantillon])	S.O.	S.O.
BD #768165 PAXgene ccfDNA 16 x 100	BD	10 ml PAXgene Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) 16 x 100 mm	768165	Insert inutile	S.O.	S.O.	Voir PAXgene Blood ccfDNA Purification Protocol Selection Tool	

* Voir aussi la liste de matériel de laboratoire disponible dans l'onglet Product Resources (Ressources produit) sur www.qiagen.com.

† Précédemment fourni par BD.

‡ Volume d'échantillon minimal requis par échantillon et par protocole (dont volume mort) ; détection de coagulum possible.

§ Volume d'échantillon minimal réduit à l'aide du Enable Less Sample mode (Autoriser une quantité moindre d'échantillon). Le Enable Less Sample mode (mode Autoriser une quantité moindre d'échantillon) a été conçu pour utiliser tout le liquide disponible en combinaison avec la détection du niveau de liquide et la détection de coagulum. Résultats du mode Enable Less Sample mode (Autoriser une quantité moindre d'échantillon) dans le marquage indéterminé des échantillons.

S.O. : sans objet.

Tiroir « Reagents and Consumables » (Réactifs et consommables)

Position A1 et/ou A2	Cartouche de réactif
Position B1	S.O.
Support de portoir à cônes 1-17	Pointes à filtre jetables, 200 µl ou 1500 µl
Support de boîtes 1-4	Boîtes contenant des cartouches de préparation d'échantillons ou 8-Rod Covers

S.O. = sans objet.

Tiroir « Waste » (Déchets)

Support de boîtes 1-4	Vider les boîtes
Support pour sac-poubelle	Sac-poubelle
Support pour flacon à déchets liquides	Flacon à déchets liquides vide

Tiroir « Eluate » (Éluat)

Fournisseur	Matériel	Exemple de N° de réf.	Catégorie	Nom à l'écran	Adaptateur sur l'emplacement d'éluat 1 (refroidi)
QIAGEN	Elution Microtubes CL 96	Fournis avec le coffret (19588)	Deep well	QIA#19588* EMTR	Elution Microtube Rack QS
Eppendorf®	1.5 ml DNA LoBind® Tube	0030108.051	Tube, 1.5 ml	EP#0030108.051** T1.5 Snap Cap	Snap-Cap Microtube QS
Sarstedt®	1.5 ml Microtube, PP, non-skirted	72607	Tube, 1.5 ml/ Tube, 1.5 ml Adapter V1 (no BC)	SAR#72.607* T1.5 Screw/SAR#72.607** T1.5 Screw	Microtube Screw Cap QS
Sarstedt	2.0 ml Microtube, PP, non-skirted	72693	Tube 2.0 ml/ Tube_2.0ml AdapterV1 (no BC)	SAR#72.693* T2.0 Screw	Microtube Screw Cap QS
Starlab®	1.5 ml Microtube, graduated conical tube, non-skirted	E1415-2231	Tube, 1.5 ml/ Tube_1.5ml AdapterV1 (no BC)	SL#E1415-2231* T1.5 Screw	Microtube Screw Cap QS, 24-wells, N° de réf. 9020674 (emplacement réfrigérant 1)
				SL#E1415-2231** T1.5 Screw	Microtube Screw Cap QS (emplacement réfrigérant 1)
				SL#E1415-2231 T1.5 Screw	1.5/2.0 ml QS (emplacements non réfrigérants 2-4)

* Indique le matériel de laboratoire qui peut être réfrigéré à l'aide d'un adaptateur réfrigérant à code-barres (transférable et utilisable sur le QIASymphony AS).

** Indique le matériel de laboratoire qui peut être réfrigéré à l'aide d'un adaptateur réfrigérant sans code-barres (non transférable et non utilisable sur le QIASymphony AS).

Matériel en plastique requis

Matériel en plastique	PAXcircDNA_2400		PAXcircDNA_4800	
	PAXcircDNA PrimaryTube_2400		PAXcircDNA PrimaryTube_4000	
	Un lot, 24 échantillons*	Deux lots, 48 échantillons*	Un lot, 24 échantillons*	Deux lots, 48 échantillons*
Disposable filter-tips, 200 µl††	24	48	24	48
Disposable filter-tips, 1500 µl††	64	128	104	200
Sample prep cartridges‡	15	30	18	36
8-Rod Covers†	3	6	3	6
	Trois lots, 72 échantillons*	Quatre lots, 96 échantillons*	Trois lots, 72 échantillons*	Quatre lots, 96 échantillons*
Disposable filter-tips, 200 µl††	72	96	72	96
Disposable filter-tips, 1500 µl††	192	256	296	392
Sample prep cartridges‡	45	60	54	72
8-Rod Covers†	9	12	9	12

* L'utilisation de moins de 24 échantillons par lot réduit le nombre de pointes à filtre jetables requises par cycle.

La réalisation de plus d'un inventaire nécessite des pointes de filtres jetables supplémentaires.

† Il y a 32 pointes à filtre par portoir de pointes à filtre.

‡ Le nombre de pointes à filtre requises correspond à 1 inventaire par cartouche de réactif.

§ Il y a 28 cartouches de préparation d'échantillons/boîte.

¶ Il y a douze manchons pour 8-Rod Covers/boîte.

Remarque : Les nombres de pointes à filtre indiqués peuvent différer des nombres affichés sur l'écran tactile en fonction des paramètres. Il est recommandé de charger le nombre maximal de cônes possible.

Volume d'éluat

Volume d'éluat choisi (µl)*	Volume d'éluat initial (µl)†
60	75

* Ceci est le volume accessible minimum d'éluat dans le tube d'éluat final pour le porte-échantillons QIAGEN EMT (N° de réf. 19588) et les tubes à bouchon à vis Sarstedt de 1,5 ml (N° de réf. 72.607). Dans certains cas, le volume d'éluat final pour des échantillons simples peut être de 5 µl ou moins.

† Le volume initial de tampon d'éluat nécessaire pour assurer le même volume réel d'éluat que le volume sélectionné.

Préparation de la Protéinase K en position 1 (et si nécessaire en position 2) de l'emplacement A

Le coffret QIAasymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit (CE-IVD) contient une solution de protéinase K prête à l'emploi. La protéinase K peut être conservée à température ambiante (15–25 °C). Pour la conserver plus longtemps, nous suggérons de conserver les flacons enzymatiques de protéinase K entre 2 et 8 °C.

Numéro d'échantillon	PAXcircDNA_2400/PAXcircDNA PrimaryTube_2400*	PAXcircDNA_4800/PAXcircDNA PrimaryTube_4000*
8	1980 µl	2860 µl
24	3740 µl	6380 µl
48	6380 µl	11660 µl†
96	11660 µl†	23320 µl†

* Pour chaque échantillon, les volumes requis sont de 110 µl (pour 2 400 µl de plasma) ou 220 µl (pour 4 800/4 000 µl de plasma), plus un volume mort supplémentaire de 1 100 µl [(n x 110 or 220 µl) + 1 100 µl].

† Si plus de 11 660 µl sont nécessaires, utilisez un deuxième tube (Corning, N° de réf. 352051). Dans le second tube, un volume mort supplémentaire de 1 100 µl est requis.

Remarque : Les tubes contenant la protéinase K sont placés dans un porte-tubes. Le porte-tubes contenant la protéinase K doivent être placés en positions 1 et 2 dans l'emplacement A du tiroir « Sample » (Échantillon). Nous recommandons d'utiliser des Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom (Corning, N° de réf. 352051) pour la protéinase K.

Historique des révisions

Date	Modifications
R1, 04/2021	Première version.
R2, 04/2021	Remplacement de « (CE 0123) » au texte de format normal par celui indiquant de suivre les exigences de conception de l'IVDR Annexe X

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®, QIASymphony® (QIAGEN Group); PAXgene® (PreAnalytix GmbH); BD™ (Becton Dickinson and Company); Corning®, Falcon® (Corning, Inc.); Eppendorf®, LoBind® (Eppendorf AG); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.); Starlab® (Starlab International GmbH). Les noms déposés, les 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.

04/2021 HB-2866-S01-002 © 2021 QIAGEN, tous droits réservés.

Pour commander www.qiagen.com/shop | Assistance technique support.qiagen.com | Site Web www.qiagen.com