

MANUEL TECHNIQUE

Maxwell® CSC Blood DNA Kit

Mode d'emploi du produit
AS1321

Mise en garde : manipulez les cartouches avec précautions ; les bords d'étanchéité peuvent être coupants.

Maxwell® CSC Blood DNA Kit

Toute la littérature technique est disponible sur : www.promega.com/protocols/
 Consultez le site Internet pour vérifier que vous utilisez bien la version la plus récente de ce manuel technique.
 Si vous avez des questions concernant l'utilisation de ce système, envoyez un courriel
 à Promega Technical Services : techserv@promega.com

1. Description.....	2
2. Composants du produit, conditions de stockage et légende des symboles	3
3. Destination/Usage prévu du produit	5
4. Limites d'utilisation du produit	5
5. Avant de commencer	6
5.A. Préparation des échantillons de sang total	6
5.B. Préparation des Maxwell® CSC Blood DNA Cartridges.....	7
6. Fonctionnement de l'appareil	9
7. Après la purification	11
8. Évaluation des performances analytiques	11
8.A. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ADN.....	12
8.B. Reproductibilité	14
8.C. Substances interférentes (inhibition)	15
8.D. Contamination croisée	15
9. Évaluation des performances cliniques	16
9.A. Amplificabilité de l'ADN	16
9.B. Reproductibilité	17
9.C. Contamination croisée	17
10. Dépannage	18
11. Références.....	19
12. Produits apparentés	19
13. Récapitulatif des modifications.....	19

Le Maxwell® CSC Blood DNA Kit n'est disponible que dans certains pays.

1. Description

Le Maxwell® CSC Blood DNA Kit^(a,b) est utilisé en association avec les appareils Maxwell® spécifiés dans le Tableau 1 pour offrir une méthode facile de purification automatique efficace de l'ADN génomique (ADNg) issu d'échantillons de sang humain. Les appareils Maxwell® CSC Instrument sont conçus pour être utilisés avec les cartouches de réactifs pré-dispensés et des réactifs supplémentaires fournis dans le kit avec des méthodes de purification préprogrammées, pour une simplicité et une facilité d'emploi maximales. Les appareils Maxwell® CSC Instrument peuvent traiter d'un nombre maximum autorisé d'échantillons en 40 minutes environ et l'ADN purifié peut être utilisé directement dans diverses applications en aval, telles que PCR.

Tableau 1. Appareils pris en charge.

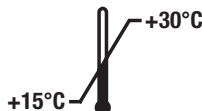
Appareil	Cat.#	Manuel technique
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Principe de la méthode : le Maxwell® CSC Blood DNA Kit purifie l'acide nucléique à l'aide de particules paramagnétiques, qui fournissent une phase solide mobile pour optimiser le prélèvement d'échantillons, le lavage et la purification de l'ADNg. Les appareils Maxwell® CSC Instrument sont des appareils magnétiques de traitement des particules qui permettent la fixation efficace de l'ADNg aux particules paramagnétiques dans le premier puits d'une cartouche préremplie et déplacent l'échantillon dans les puits de la cartouche. Cette approche de la capture magnétique évite des problèmes courants, tels que le colmatage des cônes ou des transferts partiels de réactifs, qui entraînent une purification sous-optimale par d'autres systèmes automatiques courants.

2. Composants du produit, conditions de stockage et légende des symboles

PRODUIT	TAILLE	CAT.#
Maxwell® CSC Blood DNA Kit	48 préparations	AS1321


Pour diagnostic in vitro. Usage professionnel uniquement. Suffisant pour 48 isollements automatisés à partir de 300 µl des échantillons de sang total. Les Maxwell® CSC Cartridges sont à usage unique.




Inclut :

- 2 × 1 ml Solution de protéinase K (PK)
- 20 ml Tampon de lyse
- 48 Maxwell® CSC Blood Cartridges
- 50 Plongeurs CSC/RSC
- 50 Tubes d'élution (0,5 ml)
- 20 ml Tampon d'élution

Conditions de stockage : conservez le Maxwell® CSC Blood DNA Kit entre +15 et +30 °C.

 **Informations relatives à la sécurité :** les cartouches contiennent de l'éthanol et de l'isopropanol. Ces substances doivent être considérées comme inflammables, nocives et irritantes. Le tampon de lyse contient de l'hydrochlorure de guanidine et de l'urée. Ces substances doivent être considérées comme toxiques, nocives et irritantes. Vous trouverez des informations détaillées relatives à la sécurité dans la SDS.



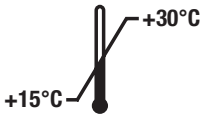











 Les composants du Maxwell® CSC Blood DNA Kit sont conçus pour être utilisés avec des substances potentiellement infectieuses. Portez des équipements de protection individuelle appropriés (ex : gants et lunettes de sécurité) lors de la manipulation de substances infectieuses. Suivez les directives de l'établissement concernant la manipulation et l'élimination de toute substance infectieuse utilisée en conjonction avec ce système.

 **Mise en garde :** manipulez les cartouches avec précautions ; les bords d'étanchéité peuvent être coupants.

Informations supplémentaires : les composants du Maxwell® CSC Blood DNA Kit sont homologués et ont passé des tests de contrôle qualité pour fonctionner ensemble. Il n'est pas recommandé de mélanger les composants du kit entre différents lots. Utilisez uniquement les composants fournis dans le kit. N'utilisez pas de cartouches reçues avec un joint endommagé.

2. Composants du produit, conditions de stockage et légende des symboles (suite)

Légende des symboles

Symbole	Explication	Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Représentant agréé
	Stocker entre +15 et +30 °C.		Fabricant
	Mise en garde		Irritant
	Danger pour la santé.		Contenu suffisant pour « n » tests.
	Conformité Européenne		Avertissement. Risque biologique.
	Avertissement. Risque de pincement.		Référence
	Numéro de lot		Ne pas réutiliser.

3. Destination/Usage prévu du produit

Le Maxwell® CSC Blood DNA Kit est conçu pour être utilisé en conjonction avec les appareils Maxwell® CSC Instrument et la méthode de purification Maxwell® CSC Blood DNA comme dispositif médical de diagnostic in vitro (IVD) pour isoler l'ADN génomique automatiquement à partir d'échantillons de sang total humain. L'ADN purifié est adapté aux essais de diagnostic in vitro fondés sur l'amplification.

Le Maxwell® CSC Blood DNA Kit est destiné à être utilisé à une température comprise entre 15 et 30 °C. Toute utilisation en dehors de cette plage de température peut produire des résultats sous-optimaux.

Les échantillons de sang total recueillis dans des tubes de sang contenant de l'EDTA, de l'héparine ou des anticoagulants au citrate de sodium peuvent être utilisés avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Le tableau ci-dessous illustre la durée de stockage acceptable des échantillons dans différentes conditions avant leur utilisation dans le Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Le Maxwell® CSC Blood DNA Kit n'est pas destiné à être utilisé avec des échantillons recueillis dans d'autres types de tubes de sang ou stockés dans d'autres conditions que celles indiquées ci-dessous.

Température de stockage des échantillons	Durée de stockage avant la purification
15–30 °C	Jusqu'à 72 heures
2–10 °C	Jusqu'à 7 jours
–80 °C ou moins	Infinie

Le Maxwell® CSC Blood DNA Kit est destiné à un usage professionnel uniquement. Les résultats de diagnostic obtenus à l'aide d'ADN génomique purifié avec ce système doivent être interprétés avec d'autres données cliniques ou de laboratoire.

4. Limites d'utilisation du produit

Le Maxwell® CSC Blood DNA Kit n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus, avec des échantillons d'autres fluides corporels que du sang total humain ni avec des échantillons de sang total humain coagulé.

Le Maxwell® CSC Blood DNA Kit n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons non humains, y compris des échantillons bactériens et viraux, ni pour la purification de l'ARN.

Les performances du Maxwell® CSC Blood DNA Kit ont été évaluées en isolant l'ADN d'échantillons de 50–300 µl de sang total avec une quantité de leucocytes comprise entre 4×10^6 et 10×10^6 leucocytes/ml.

Les performances du Maxwell® CSC Blood DNA Kit ont été évaluées afin de déterminer si elles sont compatibles avec les facteurs inhibants potentiels suivants pour l'amplification de l'ADN génomique : hème, alcool, IgG et guanidine. Les autres composés n'ont pas été évalués.

L'utilisateur est tenu de valider la performance des acides nucléiques purifiés dans les applications de diagnostic en aval. Des contrôles appropriés doivent être prévus lors des applications de diagnostic en aval utilisant de l'ADN génomique purifié avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit.

5. Avant de commencer

Matériel à fournir par l'utilisateur

- vortex de paillasse
- pipettes et cônes de pipettes pour le transfert d'échantillons dans des cartouches de réactifs préremplies
- tubes de 1,5–2,0 ml pour l'incubation des échantillons (ex : microtubes, 1,5 ml [Cat.# V1231])
- bloc chauffant réglé sur 56 °C
- **facultatif** : mélangeur de tubes rotatif pour les échantillons de sang liquide

5.A. Préparation des échantillons de sang total

Capacité de traitement des échantillons de sang total

Le rendement total de l'ADN génomique issu d'échantillons de sang total dépend du volume de l'échantillon et de la quantité de leucocytes/ml. Chacune des cartouches fournies dans le Maxwell® CSC Blood DNA Kit est conçue pour purifier l'ADN génomique dans 50–300 µl de sang total, avec une quantité de leucocytes comprise entre 4×10^6 et 10×10^6 leucocytes/ml de sang total (valeurs définies pour un adulte en bonne santé : 1). Nous recommandons de procéder à un comptage des leucocytes sur chaque échantillon avant la purification de l'ADN afin de vérifier que l'échantillon se trouve sur cette plage. Les échantillons en dehors de cette plage risquent de ne pas offrir des résultats optimaux.

Remarque : ce kit a été testé avec des échantillons de sang total humain recueillis dans des tubes d'EDTA, de citrate de sodium ou d'héparine. Les performances du produit chimique ne peuvent pas être garanties avec d'autres types de tubes de recueil de sang. Les échantillons de sang peuvent être frais (conservés entre 15–30 °C jusqu'à 72 heures), réfrigérés (conservés entre 2–10 °C jusqu'à sept jours) ou congelés (conservés à –80 °C ou moins) avant la purification de l'ADN. Les échantillons congelés doivent être décongelés avant leur traitement. Tous les échantillons de sang doivent être bien mélangés avant d'être utilisés.

1. Mélangez tous les échantillons de sang pendant au moins 5 minutes entre 15–30 °C.
2. Préparez et étiquetez tous les tubes d'incubation qui seront placés dans le bloc chauffant réglé sur 56 °C.
3. Ajoutez 30 µl de solution de protéinase K (PK) à chaque tube d'incubation.
4. Ajoutez du sang liquide (entre 50 et 300 µl) à chaque tube d'incubation. Veillez à éviter tout produit coagulé (le cas échéant) lors du transfert du sang dans le tube d'incubation. Le système ne doit pas être utilisé avec des échantillons de sang coagulé. Remplacez les cônes entre chaque transfert d'échantillon de sang pour éviter toute contamination croisée.
5. Ajoutez 300 µl de tampon de lyse à chaque tube d'incubation. Remplacez les cônes entre chaque transfert de tampon de lyse pour éviter toute contamination croisée.
6. Vortexez chaque tube à la vitesse maximale pendant 10 secondes.
7. Incubez chaque tube dans le bloc chauffant (réglé sur 56 °C) pendant 20 minutes. Pendant cette incubation, préparez les cartouches comme indiqué à la Section 5.B.

8. Inspectez chaque lysat après incubation. Après le traitement avec la protéinase K, l'échantillon passe du rouge au marron verdâtre. Si les échantillons ne changent pas de couleur après le traitement avec la protéinase K, cela indique que le traitement n'a pas été efficace et que le rendement et la pureté de l'ADN après purification seront affectés. Ne continuez pas à traiter les échantillons si vous n'observez pas de changement de couleur à la fin de la période d'incubation avec la protéinase K.
9. Transférez chaque échantillon de lysat de sang du tube d'incubation au puits n°1 d'une cartouche distincte (le puits n°1 est le plus grand de la cartouche). Remplacez les cônes entre chaque transfert d'échantillon pour éviter toute contamination croisée des échantillons.

5.B. Préparation des Maxwell® CSC Blood DNA Cartridges

1. Changez de gants avant de manipuler les cartouches, les plongeurs CSC/RSC et les tubes d'élution. Les cartouches sont installées dans le ou les portoirs de la plateforme en dehors de l'appareil et dans le ou les portoirs de la plateforme contenant les cartouches. Les échantillons sont ensuite transférés dans l'appareil pour être purifiés. Placez chaque cartouche dans le portoir de la plateforme avec le puits n°1 (le plus grand puits de la cartouche) le plus éloigné des tubes d'élution (Figure 2). Appuyez sur la cartouche vers le bas pour bien la mettre en place. Veillez à ce que les deux extrémités de la cartouche soient bien en place dans le portoir de la plateforme. Retirez délicatement le joint afin de retirer tout le joint du haut de la cartouche. Veillez à ce que toute la bande d'étanchéité et tout résidu d'adhésif soient retirés de la cartouche.



Mise en garde : manipulez les cartouches avec précaution. Les bords d'étanchéité peuvent être coupants.

2. Placez un plongeur dans le puits n°8 de chaque cartouche.
3. Placez un tube d'élution vide à la position du tube d'élution pour chaque cartouche dans le ou les portoirs de la plateforme.

Remarque : utilisez uniquement les tubes d'élution fournis dans le Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Les autres tubes d'élution ne sont pas forcément compatibles avec les appareils Maxwell® CSC Instrument et peuvent affecter les performances de purification de l'ADN.

4. Ajoutez 50–100 µl de tampon d'élution au fond de chaque tube d'élution.

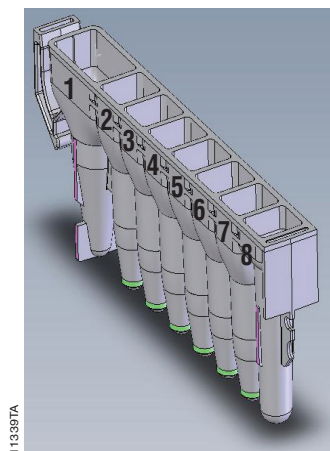
Remarque : utilisez uniquement le tampon d'élution fourni dans le Maxwell® CSC Blood DNA Kit. L'utilisation d'autres tampons d'élution peut impacter les performances de la purification de l'ADN.

Notes de préparation des Maxwell® CSC Blood DNA Cartridges



Les échantillons ou réactifs renversés sur toute partie du plateau doivent être nettoyés avec une solution d'eau et de détergent, puis une lingette ou un spray bactéricide et enfin de l'eau. N'utilisez de l'eau de Javel sur aucune partie de l'appareil.

5.B. Préparation des Maxwell® CSC Blood DNA Cartridges (suite)



Contenu du puits ajouté par l'utilisateur :

1. Échantillon de sang total lysé
8. Plongeur CSC/RSC

Figure 1. Maxwell® CSC Cartridge. Un échantillon de sang total lysé est ajouté au puits n°1 et un plongeur est ajouté au puits n°8.



Figure 2. Installation et configuration du portoir de la plateforme. Du tampon d'élution est ajouté aux tubes d'élution comme indiqué.

6. Fonctionnement de l'appareil

Vous trouverez des informations détaillées dans le manuel technique spécifique à votre Maxwell® CSC Instrument. Voir le Tableau 1.

1. Démarrez le Maxwell® Instrument et la tablette. Connectez-vous à la tablette et démarrez le logiciel Maxwell® en mode IVD en touchant deux fois l'icône sur le bureau. L'appareil réalise un autotest et place toutes les pièces mobiles en position de repos.
2. Sélectionnez **Démarrer** sur l'écran d'Accueil.
3. Scannez ou saisissez le code barres dans l'angle supérieur droit de l'étiquette du Maxwell® CSC Blood DNA Kit et appuyez sur **OK** pour sélectionner automatiquement la méthode à utiliser (Figure 3).

Remarque : le code barres de méthode du Maxwell® CSC Blood DNA Kit est requis pour la purification de l'ADN sur les appareils Maxwell® CSC Instrument. L'étiquette du kit contient deux codes barres. Le code barres de la méthode est indiqué à la Figure 3. S'il n'est pas possible de scanner le code barres, contactez Promega Technical Services.



Figure 3. Étiquette de kit indiquant le code barres à scanner. Scannez le code barres affiché dans la zone rouge en haut à droite de l'étiquette du kit pour lancer un cycle de purification.

4. Sur l'écran « Configuration des cartouches », touchez les positions de cartouches pour sélectionner ou désélectionner toute position à utiliser pour ce cycle d'extraction. Entrez toute information de suivi des échantillons requise et appuyez sur le bouton **Continuer**.

Remarque : lors de l'utilisation du Maxwell® CSC 48 Instrument, appuyez sur le bouton **Avance** ou **Recul** pour sélectionner ou désélectionner les positions des cartouches sur chaque portoir de la plateforme.

5. Une fois la porte ouverte, confirmez que tous les éléments de la liste de contrôle d'extraction ont été réalisés. Vérifiez que les échantillons prétraités ont été ajoutés au puits n°1 des cartouches, que les cartouches sont chargées sur l'appareil, que des tubes d'élution débouchés sont présents avec le tampon d'élution et que les plongeurs sont dans le puits n°8. Transférez le ou les portoirs de la plateforme contenant les cartouches préparées sur la plateforme de l'appareil Maxwell®.

6. Fonctionnement de l'appareil (suite)

Insertion du portoir de la plateforme Maxwell® : tenez le portoir de la plateforme par les côtés pour éviter de déplacer les cartouches. Vérifiez que le portoir de la plateforme est placé dans l'appareil Maxwell® avec les tubes d'élution le plus près de la porte. Inclinez l'arrière du portoir de la plateforme vers le bas et placez-le dans l'appareil de sorte que l'arrière du portoir de la plateforme repose contre l'arrière de la plateforme de l'appareil. Appuyez sur l'avant du portoir de la plateforme vers le bas pour bien installer le portoir de la plateforme sur la plateforme de l'appareil. Si vous avez des difficultés à installer le portoir sur la plateforme, vérifiez l'orientation correcte du portoir de la plateforme. Vérifiez que le portoir est à plat sur la plateforme de l'appareil et bien en place.

Remarque : vérifiez l'identifiant sur les portoirs de la plateforme Maxwell® à 24 positions afin de déterminer s'ils doivent être placés à l'avant ou à l'arrière de l'appareil.

6. Touchez le bouton **Démarrer** pour lancer le cycle d'extraction. La plateforme se rétracte et la porte se ferme.

Remarque : lorsque vous utilisez un appareil Maxwell® à 48 positions, si le système Vision a été activé, les portoirs de la plateforme seront scannés lors du retrait de la porte. Toute erreur de configuration des portoirs de la plateforme (ex : plongeurs pas dans le puits n°8, tubes d'élution absents ou ouverts) entraîne un retour du logiciel à l'écran « Configuration des cartouches » et les positions qui posent problème sont repérées par un point d'exclamation dans un cercle rouge. Touchez le point d'exclamation pour obtenir une description de l'erreur et résoudre tous les états d'erreur. Touchez à nouveau le bouton **Démarrer** pour scanner à nouveau le portoir de la plateforme et lancer l'extraction.



Avertissement : risque de pincement.

7. L'appareil Maxwell® lance immédiatement le cycle de purification. L'écran affiche les étapes réalisées et la durée restante approximative du cycle.

Remarques :

1. Le bouton **Interrompre** permet de mettre fin au cycle. Tous les échantillons d'un cycle annulé seront perdus.
2. Si le cycle est abandonné avant la fin, il pourra vous être demandé de vérifier si les plongeurs sont encore chargés sur la barre de plongeurs. Si des plongeurs sont présents sur la barre, vous devez réaliser l'**Ejection des plongeurs** lorsque cela vous est demandé. Si aucun plongeur n'est présent sur la barre, vous pouvez ignorer l'**Ejection des plongeurs** lorsque cela vous est demandé. Les échantillons seront perdus.
8. Une fois le cycle terminé, l'interface utilisateur affiche un message indiquant que la méthode est terminée.

Fin de cycle

9. Suivez les instructions à l'écran à la fin de la méthode pour ouvrir la porte. Vérifiez que les plongeurs sont situés dans le puits n°8 de la cartouche à la fin du cycle. Si les plongeurs ne sont pas retirés de la barre, suivez les instructions du manuel d'utilisation approprié à votre appareil Maxwell® (voir le Tableau 1) pour réaliser une procédure d'**Ejection des plongeurs** afin d'essayer de décharger les plongeurs.
10. Retirez le ou les portoirs de la plateforme de l'appareil juste après le cycle pour éviter l'évaporation des éluats. Retirez les tubes d'élution contenant de l'ADN et fermez les tubes.

Remarque : après la procédure de purification automatique, le ou les portoirs de la plateforme peuvent être chauds. Pour retirer le portoir de la plateforme de l'appareil, tenez-le par les côtés.

Vérifiez que les échantillons sont retirés de l'appareil avant de réaliser un protocole désinfection aux UV pour éviter d'endommager les acides nucléiques purifiés.



11. Retirez les cartouches et les plongeurs du ou des portoirs de la plateforme Maxwell®. Mettez au rebut comme déchet dangereux conformément aux procédures de votre établissement. Ne réutilisez pas les Maxwell® CSC Cartridges, les plongeurs CSC/RSC ni les tubes d'élution.

7. Après la purification

Déterminez si l'échantillon d'ADN purifié présente une concentration et une pureté conformes aux exigences de l'essai de diagnostic en aval avant de l'utiliser.

8. Évaluation des performances analytiques

L'évaluation des performances analytiques pour le Maxwell® CSC Blood DNA Kit a été réalisée avec des échantillons de sang total sur un Maxwell® CSC Instrument. L'équivalence des performances du Maxwell® CSC Blood DNA Kit et du Maxwell® CSC 48 Instrument a été démontrée dans le cadre du développement de cet appareil.

8.A. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ADN

Tableau 2. Rendement et pureté de l'ADN à partir d'échantillons de sang total avec des nombres de leucocytes différents. L'extraction de l'ADN de huit répétitions a été testée pour chaque condition indiquée afin d'évaluer la quantité, la qualité et l'amplificabilité de l'ADN. De l'ADN a été extrait de 300 µl de sang total avec des nombres de leucocytes compris entre 4×10^6 et 10×10^6 leucocytes/ml et élué dans 50 µl. L'absorbance de l'ADN purifié a été mesurée à 230 nm, 260 nm, 280 nm et 340 nm. La concentration de l'ADN a été déterminée en utilisant l'absorbance à 260 nm après soustraction de l'absorbance du contrôle à vide et correction du bruit de l'appareil (absorbance à 340 nm). Tous les calculs d'absorbance décrits dans cette évaluation des performances ont été réalisés de cette manière. La concentration de l'ADN a été multipliée par le volume de l'ADN élué afin de déterminer le rendement et les ratios A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} ont été calculés afin d'évaluer la qualité de l'ADN. Le Maxwell® CSC Blood DNA Kit a produit des quantités acceptables d'ADN ($\geq 3,00$ pg/leucocyte) pour tous les échantillons de sang total testés, indépendamment du nombre de leucocytes. Les rendements moyens de l'ADN purifié étaient de $\geq 4,18$ pg/leucocyte, avec les ratios $A_{260}/A_{280} \geq 1,89$ et $A_{260}/A_{230} \geq 1,68$.

Donneur	Rendement moyen de l'ADN total (µg) (n = 8)	Nombre de leucocytes (WBC/ml)	Rendement moyen de l'ADN par leucocyte (pg)	Ratio	
				A_{260}/A_{280} moyen	A_{260}/A_{230} moyen
1	6,0	$4,5 \times 10^6$	4,45	1,90	1,68
2	8,6	$6,9 \times 10^6$	4,18	1,89	1,91
3	12,4	$9,4 \times 10^6$	4,45	1,91	2,01

Tableau 3. Rendement et pureté de l'ADN à partir de sang total prélevé avec différents anticoagulants. La quantité et la qualité ont été évaluées pour des éluats d'ADN purifiés préparés à partir de sang total prélevé dans des tubes courants pour les prélèvements de sang contenant de l'EDTA, du citrate de sodium ou de l'héparine comme anticoagulant. Les échantillons de sang ont été réfrigérés ou congelés et ramenés à température ambiante avant l'extraction de l'ADN. De l'ADN a été purifié à partir de huit répétitions de 300 µl pour chaque anticoagulant et élué dans 50 µl. La concentration de l'ADN, le rendement de l'ADN et les ratios A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} ont été calculés et sont indiqués dans le tableau ci-dessous. Des rendements et ratios de pureté cohérents ont été observés pour l'ADN extrait de tous les échantillons avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit.

Type de tube de prélèvement de sang	Rendement moyen de l'ADN total (µg) (n = 8)	Concentration moyenne de l'ADN (ng/µl)	Ratio A_{260}/A_{280} moyen	Ratio A_{260}/A_{230} moyen
EDTA	10,97	281,28	1,91	1,94
Citrate de sodium	11,29	283,57	1,93	2,02
Héparine	11,99	307,48	1,94	2,08

Tableau 4. Amplificabilité de l'ADN extrait du sang total. L'amplificabilité a été évaluée par qPCR pour l'ADN extrait du sang total avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit et le Maxwell® CSC Instrument. Chaque échantillon d'ADN purifié a été amplifié avec une séquence cible CAPZA3 de 71 bp. Des valeurs C_q inférieures à la concentration la plus basse sur la courbe standard qPCR ont été observées pour tous les types d'échantillon et se trouvaient sur la gamme linéaire de l'essai.

Volume de sang total	Échantillon	C _q (cycles)
50 µl	1	27,17
	2	26,86
	3	26,95
	4	26,92
	5	27,23
	6	27,12
	7	27,21
	8	26,98
300 µl	1	26,90
	2	26,78
	3	26,84
	4	26,87
	5	26,66
	6	26,66
	7	26,84
	8	26,75

8.B. Reproductibilité

Tableau 5. Reproductibilité entre les utilisateurs et les jours. La reproductibilité de la purification de l'ADN a été déterminée entre différents utilisateurs et jours avec huit répétitions d'un seul échantillon de sang de la manière suivante :

- Trois utilisateurs ont purifié de l'ADN d'échantillons de répétitions du même échantillon de sang total avec le même Maxwell® CSC Instrument et le même jour, avec un cycle de purification par utilisateur afin de caractériser la reproductibilité entre différents utilisateurs.
- Un utilisateur a purifié de l'ADN d'échantillons de répétitions du même échantillon de sang avec le même Maxwell® CSC Instrument, avec un cycle par jour pendant 5 jours afin de caractériser la reproductibilité sur des jours différents.

Tous les cycles de purification incluaient huit répétitions de 300 µl de sang total. Le rendement moyen, les ratios A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} et le pourcentage de coefficient de variation (% CV) ont été calculés sur et entre les utilisateurs et les jours. Les rendements et rapports de pureté de l'ADN extrait avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit étaient reproductibles sur toutes les variables testées.

		Rendement moyen de l'ADN total (µg) (n = 8)	% CV	Ratio A_{260}/A_{280} moyen	% CV	Ratio A_{260}/A_{230} moyen	% CV
Utilisateur	1	11,18	5,7	1,93	0,2	2,00	3,4
	2	10,02	8,8	1,91	0,2	1,92	5,2
	3	12,27	4,2	1,92	0,3	1,92	4,4
Moyenne de trois utilisateurs différents		11,16	10,3	1,92	0,4	1,95	4,6
Jour	1	11,88	5,3	1,93	0,4	1,93	5,1
	2	12,27	4,2	1,92	0,3	1,92	4,4
	3	12,78	6,9	1,93	0,3	1,93	3,6
	4	11,31	8,6	1,91	0,3	1,89	4,6
	5	12,92	5,5	1,93	0,3	1,92	3,0
Moyenne de cinq jours différents		12,23	7,7	1,92	0,4	1,92	4,1

8.C. Substances interférentes (inhibition)

Tableau 6. Inhibition de l'amplification de l'ADN extrait de sang total contenant différents anticoagulants. L'inhibition de l'amplification de l'ADN a été évaluée pour l'ADN extrait du sang total avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit et le Maxwell® CSC Instrument. De l'ADN a été purifié à partir d'échantillons de 300 µl de sang total prélevé dans des tubes contenant de l'EDTA, de l'héparine et du citrate de sodium avec huit répétitions par type de tube. L'effet de substances interférentes pouvant être présentes dans l'ADN extrait a été caractérisé avec un ADN témoin positif exogène du commerce. L'ADN témoin positif exogène a été amplifié en présence et en l'absence d'éluat d'ADN de chaque répétition de sang total et les résultats ont été comparés afin de déterminer s'il y avait des facteurs inhibants dans les éluats d'ADN. La différence de valeur C_q (ΔC_q) pour les deux amplifications a été calculée en soustrayant la valeur C_q de l'amplification de l'ADN témoin de la valeur C_q de l'amplification contenant l'ADN extrait avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Une valeur ΔC_q inférieure à 2 cycles indiquait que toute incorporation d'inhibiteurs depuis les tubes de prélèvement de sang, le sang total ou les réactifs de purification de l'ADN avait un effet limité sur l'amplification. Les valeurs ΔC_q moyennes pour tous les éluats d'ADN étaient $\leq 1,87$ cycle, ce qui démontre que l'ADN extrait avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit ne présentait aucun inhibiteur détectable de l'amplification de l'ADN.

	Valeur C_q moyenne (cycles d'amplification ; n = 8)	Valeur ΔC_q moyenne (cycles d'amplification ; n = 8)
Aucun éluat	30,49	NA
EDTA	32,36	1,87
Héparine	31,85	1,36
Citrate de sodium	32,19	1,70

8.D. Contamination croisée

Des échantillons de sang total de femmes et d'hommes ont été utilisés en différentes positions sur la plateforme de cartouche du Maxwell® CSC Instrument afin d'évaluer s'il y avait eu une contamination croisée pendant l'extraction de l'ADN. L'ADN purifié a été amplifié avec un essai qPCR spécifique au chromosome Y afin de détecter de l'ADN masculin et de vérifier qu'aucun ADN de chromosome Y contaminant n'était présent dans les éluats provenant d'échantillons féminins. Tout résultat de concentration inférieur à la concentration la plus basse sur la courbe standard indique l'absence de tout ADN contaminant. Aucune contamination croisée n'a été détectée lorsque l'ADN a été purifié avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit et le Maxwell® CSC Instrument.

9. Évaluation des performances cliniques

L'évaluation des performances cliniques du Maxwell® CSC Blood DNA Kit a été réalisée par un laboratoire clinique externe avec des échantillons de sang humain et le Maxwell® CSC Instrument.

9.A. Amplificabilité de l'ADN

Tableau 7. Amplificabilité de l'ADN extrait du sang total avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit et la méthode de référence du laboratoire. Pour évaluer l'amplificabilité de l'ADN, de l'ADN a été purifié à partir de 16 échantillons de sang différents avec un volume d'entrée d'échantillon de 50 µl et un volume d'élution de 100 µl. De l'ADN a également été purifié à partir des mêmes échantillons de sang avec un volume d'entrée d'échantillon de 300 µl et un volume d'élution de 50 µl afin de couvrir la plage des volumes d'entrée et d'élution pour le Maxwell® CSC Blood DNA Kit. L'ADN extrait des mêmes échantillons a été purifié selon la méthode de purification des acides nucléiques standard du laboratoire (méthode de référence du laboratoire) pour comparaison. L'ADN élué a été utilisé comme référence dans le test de diagnostic moléculaire du laboratoire clinique pour JAK2 V617F afin de démontrer que l'ADN extrait pouvait être amplifié avec un essai qPCR. Ce test qPCR utilise deux ensembles d'amorces : l'un est spécifique au gène de type sauvage, l'autre au mutant V617F. Seules les données de l'essai qPCR sur le type sauvage ont été utilisées pour cette étude car le but de l'évaluation des performances cliniques était de démontrer que l'ADN extrait avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit pouvait être amplifié dans un test de diagnostic basé sur l'amplification, pas de tester la sensibilité ni la spécificité de l'essai de diagnostic.

Le rendement et les résultats qPCR pour l'ADN obtenu à partir des mêmes échantillons avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit et la méthode de référence du laboratoire ont été comparés. Les échantillons extraits avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit utilisaient la combinaison du plus petit volume de sang d'entrée (50 µl) et du plus grand volume d'élution (100 µl) afin de représenter le rendement minimum du Maxwell® CSC Blood DNA Kit, alors que la méthode de référence du laboratoire utilisait ses volumes d'entrée et d'élution standard de 400 µl chacun. La concentration de l'ADN, mesurée à ng/µl, a été déterminée pour 16 échantillons de sang distincts par absorbance à 260 nm. Le Maxwell® CSC Blood DNA Kit présentait un rendement d'ADN similaire pour tous les échantillons par rapport à la méthode de référence du laboratoire ; le ratio du rendement de l'ADN entre le Maxwell® CSC Blood DNA Kit et la méthode de référence du laboratoire était inférieur à 2. Tous les échantillons ont produit une valeur C_q sur la plage valide comprise entre 10 et 35.

Nombre d'échantillons testés	Volume de l'échantillon d'entrée	Volume d'élution	Maxwell® CSC respecte les critères d'acceptation (valeur C_q sur la gamme linéaire)	Concordance du Maxwell® CSC avec la méthode de référence du laboratoire pour le rendement de l'ADN
	Maxwell® CSC (µl)	Maxwell® CSC (µl)		
16	50	100	16 sur 16	16 sur 16
16	300	50	16 sur 16	Méthode de référence du laboratoire non testée à ce volume d'entrée/élution

9.B. Reproductibilité

Tableau 8. Reproductibilité entre les testeurs. L'ADN a été purifié à partir de 8 échantillons de sang total différents par 2 testeurs distincts avec le Maxwell® CSC Instrument et le Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Des éluats de chaque échantillon ont été testés en double par qPCR afin de déterminer le rendement, selon la procédure d'amplification JAK2 V617F du laboratoire clinique, avec le type sauvage de l'essai pour cette analyse. Le rendement et les résultats des essais qPCR pour l'ADN obtenu à partir des même échantillons par deux testeurs différents avec le système Maxwell® CSC ont été comparés pour deux combinaisons différentes de volume d'élution et d'entrée, avec 8 échantillons différents pour chaque combinaison. L'ADN de tous les échantillons obtenu par les deux testeurs a produit une valeur C_q sur la plage valide comprise entre 10 et 35. La concentration de l'ADN, mesurée en ng/μl d'ADN dans l'éluat, a été déterminée par absorbance à 260 nm et le ratio du rendement de l'ADN obtenu à partir du même échantillon par le testeur 1 sur celui du testeur 2 était compris entre 0,5 et 2,0 pour tous les échantillons.

Nombre d'échantillons par testeur	Volume de l'échantillon d'entrée Maxwell® CSC (μl)	Volume d'élution Maxwell® CSC (μl)	Valeur Ct sur la gamme linéaire de l'essai ; 8 échantillons par testeur	Concordance entre le testeur 1 et le testeur 2
8	50	100	16 sur 16	8 sur 8
8	300	50	16 sur 16	8 sur 8

9.C. Contamination croisée

La contamination croisée pendant la purification de l'ADN dans l'environnement utilisateur prévu a été évaluée pour des éluats préparés à partir de sang total avec le Maxwell® CSC Blood DNA Kit et le Maxwell® CSC Instrument. Des échantillons de sang et des témoins négatifs (contrôles à vide avec de l'eau) ont été analysés en différentes positions sur la plateforme de cartouche du Maxwell® CSC Instrument. L'ADN a été purifié à partir de 8 échantillons de sang différents, avec un volume d'entrée d'échantillon de 300 μl et un volume d'élution de 50 μl et 8 échantillons de contrôle négatifs.

Les éluats de chaque échantillon de contrôle négatif ont été testés en double par qPCR selon la procédure d'amplification JAK2 V617F du laboratoire de test. Tous les critères d'acceptation ont été remplis. Aucun ADN contaminant n'a été détecté dans aucun éluat de contrôle négatif.

10. Dépannage

Pour les questions qui ne sont pas abordées ici, contactez votre succursale ou distributeur local Promega.
Les coordonnées sont disponibles à l'adresse : **www.promega.com**. Courriel : **techserv@promega.com**

Symptômes	Causes et commentaires
Concentration plus basse que prévu	L'ADN du sang qui a subi plusieurs cycles de congélation-décongélation a pu être dégradé. Utilisez des échantillons recueillis et conservés dans les conditions indiquées à la Section 3.
Un échantillon de 300 µl de sang total contenant 4×10^6 à 10×10^6 leucocytes/ml devrait produire >80 ng/µl d'ADN génomique dans un volume d'élution de 50 µl (mesuré par absorbance à 260 nm).	L'échantillon de sang total contenait une faible quantité de leucocytes. Le rendement de l'ADN génomique à partir d'échantillons de sang dépend du nombre de leucocytes présents dans l'échantillon. La solution de protéinase K n'a pas été ajoutée, un volume incomplet de solution de protéinase K a été ajouté ou la protéinase K n'a pas été bien mélangée avec l'échantillon de sang avant l'ajout de tampon de lyse. La lyse et le rendement dépendent de l'extraction complète avec la protéinase K. S'il n'a pas été ajouté de protéinase K à la Section 5.A, étape 3, l'échantillon de sang obtenu sera rouge. Les échantillons traités avec la protéinase K deviennent marron verdâtre, ce qui indique que de la protéinase K a été ajoutée à l'échantillon. L'échantillon de sang total n'a pas été mélangé avant le traitement. Veuillez à mélanger les échantillons de sang total avant le traitement pour garantir que les leucocytes soient en suspension.
Pureté plus basse que prévu	La solution de protéinase K n'a pas été ajoutée, un volume incomplet de solution de protéinase K a été ajouté ou la protéinase K n'a pas été bien mélangée avec l'échantillon de sang avant l'ajout de tampon de lyse. La lyse et la pureté dépendent de l'extraction complète avec la protéinase K. S'il n'a pas été ajouté de protéinase K à la Section 5.A, étape 3, l'échantillon de sang obtenu sera rouge. Les échantillons traités avec la protéinase K deviennent marron verdâtre, ce qui indique que de la protéinase K a été ajoutée.

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif qui a entraîné, ou pourrait entraîner, le décès ou une grave blessure d'un utilisateur ou patient doit être signalé immédiatement au fabricant. Les utilisateurs installés dans l'Union Européenne devraient également signaler tout incident grave à l'Autorité Compétente de l'État Membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

11. Références

1. Henry, J.B. (2001) *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20th ed., W.B. Saunders Company, 509.

12. Produits apparentés

Instruments et accessoires

Produit	Taille	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	1 chacun	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 chacun	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 chacun	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 chacun	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 chacun	AS8402
Microtube, 1,5 ml	1 000/pack	V1231

*Pour diagnostic in vitro. Ce produit n'est disponible que dans certains pays.

Kits de réactifs Maxwell® CSC

Visitez **www.promega.com** pour une liste des kits de purification Maxwell® CSC disponibles.

13. Récapitulatif des modifications

Les modifications suivantes ont été apportées lors de la révision de ce document datant de octobre 2022 :

1. La Section 3 a été renommée Destination/Usage prévu du produit.
2. Les Sections 8 et 9 ont été ajoutées et les sections suivantes ont été renumérotées.
3. Mise à jour pour la conformité à la réglementation (UE) 2017/746 sur les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

^(a)Numéro de brevet américain 6 855 499 et autres brevets.

^(b)Numéro de brevet américain 7 329 488 et numéro de brevet coréen 10-0483684.

© 2012–2022 Promega Corporation. Tous droits réservés.

Maxwell est une marque déposée de Promega Corporation.

Les produits peuvent être couverts par des brevets publiés ou en attente d'approbation ou peuvent présenter certaines limites. Veuillez consulter notre site Web pour plus d'informations.

Tous les prix et spécifications peuvent être modifiés sans préavis.

Les allégations concernant les produits peuvent être modifiées. Veuillez contacter Promega Technical Services ou accéder au catalogue en ligne de Promega pour bénéficier des informations les plus récentes sur les produits Promega.