

MANUEL TECHNIQUE

Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit

Mode d'emploi du produit
AS1580

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

Remarque : pour utiliser le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit, la méthode
Maxwell® CSC Rapid ccfDNA doit être chargée sur le Maxwell® CSC
ou Maxwell® CSC 48 Instrument.

Maxwell[®] CSC Rapid ccfDNA 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 e-mail 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. Préparation d'échantillons de plasma.....	5
6. Préparation de Maxwell [®] CSC Rapid ccfDNA Cartridges	6
7. Installation et utilisation du Maxwell [®] Instrument	9
8. Après la purification	11
9. Évaluation des performances analytiques	11
9.A. Quantité et qualité du ccfDNA	12
9.B. Amplificabilité et inhibition (substances interférentes)	13
9.C. Quantification du ccfDNA par colorant fluorescent et qPCR.....	14
9.D. Reproductibilité	14
9.E. Contamination croisée	15
9.F. Compatibilité avec le séquençage de nouvelle génération	15
9.G. Compatibilité avec la PCR digitale	15
10. Évaluation des performances cliniques	16
11. Considérations relatives à l'utilisation du ccfDNA	16
11.A. Préparation du plasma	16
11.B. Recommandations pour la quantification du ccfDNA	17
12. Dépannage	18
13. Produits associés	19

Le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit n'est disponible que dans certains pays.

1. Description

Le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit est utilisé avec les appareils Maxwell® spécifiés au Tableau 1 afin d'offrir une méthode facile, automatique et efficace de préparation d'extraction et de purification de l'ADN libre circulant (ccfDNA) dans des échantillons de 1–4 ml de plasma humain. Les Maxwell® CSC Instruments sont conçus pour être utilisés avec des cartouches de réactifs pré-dispensés et des méthodes d'extraction préprogrammées, pour une simplicité et une facilité d'emploi maximales. La méthode Maxwell® CSC Rapid ccfDNA peut traiter d'un au nombre maximum d'échantillons pris en charge par les Maxwell® CSC Instruments en moins de 30 minutes. Le ccfDNA extrait peut être utilisé directement dans différentes applications en aval, comme la PCR digitale et le séquençage de nouvelle génération (NGS).

Tableau 1. Appareils pris en charge.

Appareil	Cat. #	Manuel technique	Nombre maximal d'échantillons
Maxwell® CSC	AS6000	TM457	16
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623	48

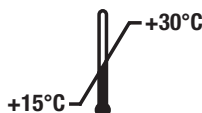
Principe de la méthode

Le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit purifie le ccfDNA issu d'échantillons de plasma à l'aide de particules paramagnétiques, qui fournissent une phase solide mobile qui optimise le prélèvement d'échantillons, le lavage et la purification du ccfDNA. Les appareils Maxwell® Instrument sont des appareils magnétiques de traitement des particules qui permettent la fixation efficace du ccfDNA aux particules paramagnétiques dans les trois premiers puits d'une cartouche préremplie. Les échantillons sont traités par une série de lavages avant l'élution du ccfDNA. 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 Rapid ccfDNA Kit	48 préparations	AS1580

Pour diagnostic in vitro. Usage professionnel uniquement. Contient une quantité suffisante de réactifs pour 48 isollements de ccfDNA automatisés à partir d'échantillons de plasma. Les cartouches sont à usage unique.



Inclut :

- 48 Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (CSCS)
- 50 CSC/RSC Plungers
- 50 Elution Tubes (0,5 ml)
- 20 ml Elution Buffer (RCFD)
- 1 ml Solution de protéinase K (PK2)

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



Informations relatives à la sécurité : vous trouverez des informations détaillées relatives à la sécurité dans la fiche de données de sécurité (SDS). Suivez les directives de l'établissement concernant la manipulation et l'élimination de tout déchet chimique utilisé en conjonction avec ce système.



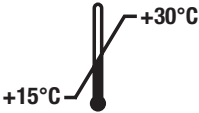
Les Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (CSCS) sont conçues pour être utilisées avec des substances potentiellement infectieuses. Portez une protection appropriée (ex : gants et lunettes de sécurité) lors de la manipulation de substances infectieuses. Suivez les directives de votre établissement concernant 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 Rapid ccfDNA Kit sont homologués et ont passé des tests de contrôle qualité pour fonctionner ensemble. Ne mélangez pas les composants du kit entre différents lots. Utilisez uniquement les composants fournis dans le kit. Pour plus d'informations relatives à la sécurité, voir la fiche de données de sécurité, disponible à l'adresse suivante : www.promega.com

Légende des symboles

Symbole	Explication	Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Représentant agréé
	Stocker à une température comprise entre +15 °C 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 Rapid ccfDNA Kit est conçu pour être utilisé en conjonction avec les Maxwell® CSC Instruments et la méthode Maxwell® CSC Rapid ccfDNA comme dispositif médical de diagnostic in vitro (IVD) pour isoler automatiquement l'ADN libre circulant à partir d'échantillons de plasma humain. Le ccfDNA purifié est adapté aux essais de diagnostic in vitro fondés sur l'amplification, y compris la PCR digitale.

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

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

4. Limites d'utilisation du produit

Les performances du Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit ont été évaluées avec des échantillons de plasma humain préparés à partir de sang total recueilli dans un appareil Streck Cell-Free DNA BCT et dans des tubes de prélèvement de sang avec anticoagulant K₂EDTA. L'utilisateur est tenu de valider l'utilisation du Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit pour purifier le ccfDNA issu du plasma recueilli dans d'autres tubes de prélèvement de sang.

L'adéquation de l'acide nucléique purifié avec le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit pour être utilisé dans le cadre du séquençage de nouvelle génération (NGS) a été démontrée pendant le développement du produit, mais n'a pas encore été validée.

Toute application de diagnostic en aval utilisant du ccfDNA purifié avec le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit doit inclure des contrôles appropriés. L'utilisateur est tenu de valider la performance des acides nucléiques purifiés dans les applications de diagnostic en aval.

5. Préparation d'échantillons de plasma

Matériel à fournir par l'utilisateur

- Sang total ou plasma
- Centrifugeuse de paillasse

Pour le sang total recueilli dans des tubes avec EDTA, le sang doit être traité immédiatement après son prélèvement, ou conservé entre +2 °C et +10 °C jusqu'à la préparation du plasma. Centrifugez le sang total des tubes avec EDTA pendant ≥10 minutes à ≥2 000 × g afin d'agglomérer les globules rouges et blancs. Pour les appareils Streck Cell-Free DNA BCT®, suivez les instructions du fabricant. Après la centrifugation initiale du Streck Cell-Free DNA BCT® ou des tubes de prélèvement de sang avec EDTA, utilisez une pipette pour retirer délicatement le plus de plasma possible sans altérer la couche leucocyto-plaquettaire et le transférer dans un nouveau tube. Pour vous assurer que vous ne transférez aucun globule blanc, centrifugez le plasma une deuxième fois pendant ≥10 minutes à ≥2 000 × g, et transférez le surnageant dans un tube propre.

Conservez le plasma entre +2 °C et +10 °C pendant 1 semaine au maximum. Pour un stockage de plus longue durée, conservez le plasma entre -30 °C et -10 °C (ou à une température inférieure à -65 °C). Évitez d'exposer le plasma à des cycles de congélation-décongélation. Vous trouverez les conditions d'utilisation du plasma congelé à la section 11.A.

6. Préparation de Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges

1. Changez de gants avant de manipuler les Maxwell® CSC Cartridges, les CSC/RSC Plungers et les Elution Tubes (0,5 ml). Placez les cartouches à utiliser dans le ou les plateaux Maxwell® CSC/RSC avec le puits n°1 (le premier des plus grands puits de la cartouche) orienté dans le sens opposé aux tubes d'élution. Appuyez sur la cartouche vers le bas pour bien la mettre en place. 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 avant de placer les cartouches dans l'appareil.



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

2. En fonction du volume total des échantillons de plasma, transférez du plasma dans le puits n° 1 uniquement (le premier des plus grands puits), dans les puits n° 1 et n° 3 uniquement (le premier et le troisième des plus grands puits) ou dans les puits n° 1, n° 2 et n° 3 (les trois plus grands puits) de la cartouche Maxwell® CSC Rapid ccfDNA comme indiqué au Tableau 2. Changez les cônes de pipette entre les échantillons de plasma afin d'éviter toute contamination croisée.

Tableau 2. Transfert d'échantillons de plasma vers différents puits de la Maxwell® CSC Cartridge en fonction du volume d'entrée d'échantillon.

Volume d'échantillon (ml)	Instructions de transfert des échantillons
1,0 ml à 1,5 ml de plasma	Ajoutez du plasma dans le puits n° 1 uniquement. Voir la Figure 1, panneau A.
>1,5 ml à ≤3,0 ml de plasma	Ajoutez des volumes égaux de plasma dans les puits n° 1 et n° 3. Voir la Figure 1, panneau B.
3,0 ml à 4,0 ml de plasma	Ajoutez des volumes égaux de plasma dans les puits n° 1, n° 2 et n° 3. Voir la Figure 1, panneau C.

Remarques :

- **Ne versez pas plus de 1,5 ml de plasma par puits.**
- **Avec des volumes d'entrée de plasma de 1,0–1,5 ml, tout l'échantillon de plasma doit être chargé dans le puits n° 1 uniquement.** Le chargement de plasma dans le puits n° 2 ou n° 3 aura une incidence négative sur la récupération du ccfDNA.
- **Avec des volumes d'entrée de plasma de 1,5–3,0 ml, le plasma doit être chargé dans les puits n° 1 et n° 3 uniquement.** Le chargement de plasma dans toute autre configuration de puits (par exemple dans les puits n° 2 et n° 3 ou n° 1 et n° 2) aura une incidence négative sur la récupération du ccfDNA.

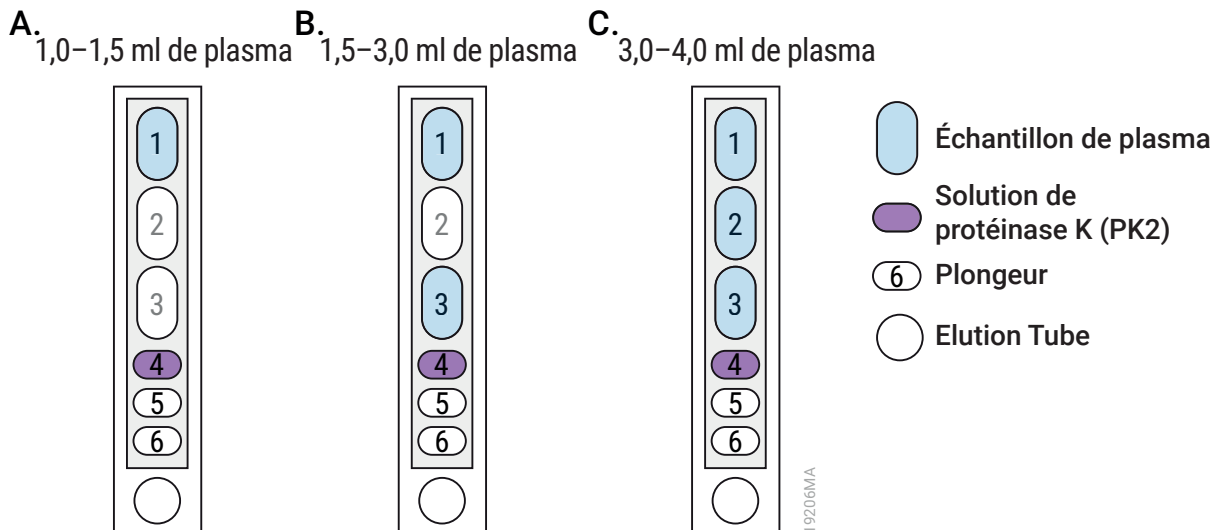


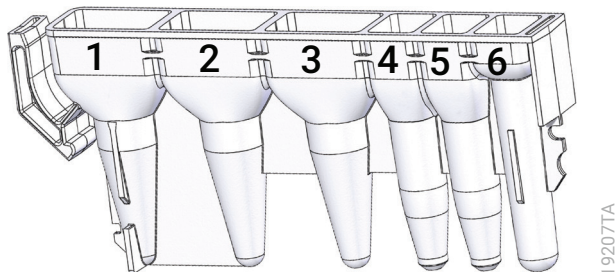
Figure 1. Le transfert d'échantillons de plasma vers différents puits de la Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge dépend du volume d'entrée d'échantillon. Pour des échantillons de plasma de 1,0–1,5 ml, transférez tout l'échantillon dans le puits n° 1 (**Panneau A**). Pour des échantillons de plasma de 1,5–3,0 ml, transférez des volumes égaux de plasma dans les puits n° 1 et n° 3 (**Panneau B**). Pour des échantillons de plasma de 3,0–4,0 ml, transférez des volumes égaux de plasma dans les puits n° 1, n° 2 et n° 3 (**Panneau C**). Versez 10 µl de solution de protéinase K (PK2) dans le puits n° 4. Ajoutez 50 µl d'Elution Buffer (RCFD) dans l'Elution Tube (représenté par le cercle en bas de chaque panneau). Placez un plongeur dans le puits n° 6.

3. Versez 10 µl de solution de protéinase K (PK2) dans le puits n° 4.
4. Placez un plongeur dans le puits n° 6 de chaque cartouche.
5. Placez un Elution Tube vide à la position du tube d'élution pour chaque cartouche dans le plateau. Ajoutez 50 µl d'Elution Buffer (RCFD) au fond de chaque Elution Tube.
6. Passez à la Section 7, Installation et utilisation du Maxwell® Instrument.

Remarques :

- a. 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 du Maxwell® Instrument.
- b. Utilisez uniquement les Elution Tubes de 0,5 ml fournis dans le kit ; les autres tubes peuvent être incompatibles avec le Maxwell® Instrument.
- c. L'Elution Buffer (RCFD) fourni est essentiel pour une récupération efficace du ccfDNA. Ne remplacez pas l'Elution Buffer (RCFD) par d'autres tampons d'élution. L'utilisation d'autres tampons d'élution aurait une incidence négative sur la récupération du ccfDNA.
- d. Il est possible d'obtenir des concentrations supérieures de ccfDNA avec moins de 50 µl d'Elution Buffer (RCFD), mais le rendement total peut être réduit.

6. Préparation de Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridges (suite)



L'utilisateur ajoute dans les puits :

1. Échantillon de plasma (Voir le Tableau 2 et la Figure 1 pour plus de détails.)
ou
- 1.,3. Échantillon de plasma
ou
- 1.,2.,3. Échantillon de plasma
4. Solution de protéinase K (PK2)
6. CSC/RSC Plunger

Figure 2. Maxwell® CSC Cartridge. L'échantillon de plasma est ajouté dans le puits n° 1 (1,0–1,5 ml d'échantillon), dans les puits n° 1 et n° 3 (1,5–3,0 ml d'échantillon) ou dans les puits n° 1, n° 2 et n° 3 (3,0–4,0 ml d'échantillon) en fonction du volume d'échantillon ; 10 µl de solution de protéinase K (PK2) sont versés dans le puits n° 4 et un plongeur est ajouté au puits n° 6.



Figure 3. Installation et configuration du ou des plateaux. De l'Elution Buffer (RCFD) est ajouté aux tubes d'élution comme indiqué. Les plongeurs se trouvent dans la position n° 6 de la cartouche. Le plateau illustré est issu du Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000).

7. Installation et utilisation du Maxwell® Instrument

Vous trouverez des informations détaillées dans le manuel d'utilisation 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® IVD-mode 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 Rapid ccfDNA Kit et sélectionnez **OK** pour sélectionner automatiquement la méthode à utiliser (Figure 4).

Remarque : le code barres de méthode du Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit est requis pour la purification du ccfDNA sur les Maxwell® CSC Instruments. L'étiquette du kit contient deux codes barres. Le code barres de la méthode est indiqué à la Figure 4. S'il n'est pas possible de scanner le code barres, contactez Promega Technical Services.



Figure 4. Étiquette de kit indiquant le code barres à scanner. Le code barres à scanner pour lancer un cycle de purification est indiqué dans le rectangle bleu en haut à droite de l'étiquette du kit.

4. Sur l'écran « Configuration des cartouches », confirmez que la méthode Maxwell® CSC Rapid ccfDNA est affichée en haut de l'écran. Sélectionnez 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 sélectionnez 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 plateau.

7. Installation et utilisation de l'appareil Maxwell® (suite)

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 de plasma ont été ajoutés aux puits appropriés des cartouches, que de la solution de protéinase K (PK2) a été ajoutée au puits n° 4 de la cartouche, que des plongeurs ont été ajoutés dans le puits n° 6, que les cartouches sont chargées sur l'appareil et que des tubes d'élution débouchés sont présents avec l'Elution Buffer (RCFD). Transférez le ou les plateaux contenant les cartouches préparées sur la plateforme du Maxwell® Instrument.

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

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

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



Avertissement : risque de pincement.

Remarque : si vous utilisez un Maxwell® Instrument à 48 positions et si le Vision System a été activé, les plateaux seront scannés lors du retrait de la plateforme. Toute erreur de configuration des plateaux (ex : plongeurs pas dans le puits n° 6, 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. Sélectionnez le point d'exclamation pour obtenir une description de l'erreur et résoudre tous les états d'erreur. Sélectionnez à nouveau le bouton **Démarrer** pour scanner à nouveau le plateau et lancer le cycle d'extraction.

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

Remarques :

- a. Le bouton **Interrompre** permet de mettre fin au cycle. Tous les échantillons d'un cycle interrompu seront perdus.
 - b. 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 du Maxwell® Instrument. Si des plongeurs sont présents sur la barre, réalisez l'**Éjection des plongeurs** lorsque cela vous est demandé. Si aucun plongeur n'est présent sur la barre, vous pouvez ignorer l'**Éjection 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° 6 de la cartouche à la fin du cycle. Si les plongeurs n'ont pas été retirés de la barre, suivez les instructions du manuel technique approprié à votre Maxwell® Instrument (voir le Tableau 1) pour réaliser une procédure d'**Éjection des plongeurs** afin d'essayer de décharger les plongeurs.
10. Retirez le ou les plateaux de l'appareil juste après le cycle pour éviter l'évaporation des éluats. Retirez les tubes d'élution contenant du ccfDNA, et bouchez les tubes.
Vérifiez que les échantillons d'acide nucléique purifié sont retirés de l'appareil avant de réaliser un protocole de désinfection aux UV pour éviter d'endommager les acides nucléiques.
11. Retirez les cartouches et les plongeurs du ou des plateaux Maxwell®. Mettez au rebut comme déchet dangereux conformément aux procédures de votre établissement. Ne réutilisez pas les Maxwell® CSC Cartridges, les CSC/RSC Plungers ni les Elution Tubes.



8. Après la purification

Déterminez si l'échantillon de ccfDNA purifié est conforme aux exigences de l'essai de diagnostic en aval approprié avant de l'utiliser. Si les échantillons de ccfDNA purifié ne sont pas traités immédiatement, stockez les échantillons de ccfDNA à 4 °C jusqu'à 7 jours. Pour un stockage de plus longue durée, congelez à -20 °C ou -70 °C et moins. Consultez les recommandations spécifiques au stockage et au traitement des échantillons de ccfDNA dans les instructions pour les applications en aval.

9. Évaluation des performances analytiques

Les performances analytiques du Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit ont été évaluées avec des échantillons de plasma humain sur les Maxwell® CSC et Maxwell® CSC 48 Instruments. Des mesures clés, telles que la quantité, la qualité, l'amplificabilité, la reproductibilité et la contamination croisée du ccfDNA, ont été évaluées afin de confirmer la fiabilité et l'adéquation du ccfDNA extrait à l'aide du Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit pour les applications en aval.

9.A. Quantité et qualité du ccfDNA

Des échantillons de plasma ont été isolés du sang de six personnes recueilli dans des tubes avec K₂EDTA ou des Streck Cell-Free DNA BCT®. Le ccfDNA a été extrait d'échantillons de 1–4 ml de plasma avec le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit. La quantité et la qualité du ccfDNA ont été évaluées grâce à l'analyse TapeStation (Agilent Technologies, Inc.) d'un réplicat biologique par condition, en se concentrant sur le pourcentage d'ADN libre circulant (ccfDNA) et sur la taille du plus grand pic d'ADN, ce qui reflète la qualité des fragments. Le pourcentage de ccfDNA désigne le rapport des fragments d'ADN sur la plage 50–700 bp par rapport à l'ensemble de l'ADN dans l'échantillon purifié comme indiqué dans l'analyse TapeStation. Cette valeur fournit une indication de l'enrichissement des échantillons pour le ccfDNA, qui est généralement de plus petite taille en raison de son origine issue d'ADN fragmenté libéré après la mort cellulaire.

L'analyse TapeStation indiquait que la plage de pourcentage de ccfDNA était de 76–93 %, et les plus grandes tailles de pics étaient comprises entre 177 bp et 203 bp sur l'ensemble des échantillons de ccfDNA purifiés. Il n'y avait pas de différence significative de proportion ni de qualité du ccfDNA extrait du plasma recueilli dans différents tubes avec anticoagulant ou différents volumes d'entrée d'échantillons de plasma.

Tableau 3. Analyse TapeStation du ccfDNA purifié indiquant le pourcentage d'ADN libre circulant et la taille du plus grand pic pour divers volumes d'entrée d'échantillons de plasma et anticoagulants.

ID échantillon (anticoagulant)	Volume d'entrée d'échantillon de plasma (ml)	Pourcentage d'ADN libre circulant	Plus grande taille de pic (bp)
1 (K ₂ EDTA)	1,0	81	186
	1,5	79	181
	3,0	80	183
	4,0	79	183
2 (K ₂ EDTA)	1,0	81	177
	1,5	88	178
	3,0	84	179
	4,0	91	175
3 (K ₂ EDTA)	1,0	90	184
	1,5	90	187
	3,0	89	183
	4,0	88	185

ID échantillon (anticoagulant)	Volume d'entrée d'échantillon de plasma (ml)	Pourcentage d'ADN libre circulant	Plus grande taille de pic (bp)
4 (Streck)	1,0	93	195
	1,5	76	200
	3,0	89	193
	4,0	84	192
5 (Streck)	1,0	92	195
	1,5	92	197
	3,0	90	195
	4,0	89	194
6 (Streck)	1,0	89	183
	1,5	79	182
	3,0	86	203
	4,0	86	203

9.B. Amplificabilité et inhibition (substances interférentes)

L'amplificabilité du ccfDNA purifié et l'absence d'inhibition ont été évaluées au moyen d'un essai qPCR pour amplifier une cible d'ADN 75 bp et analyser une éventuelle inhibition dans les données qPCR. Le ccfDNA a été extrait en quatre exemplaires de chacun des échantillons de 4 ml de plasma humain recueillis chez six personnes dans des tubes avec K₂EDTA ou des Streck Cell-Free DNA BCT®. Chaque échantillon de ccfDNA extrait a été analysé par l'essai qPCR. Les valeurs $|\Delta C_q|$ moyennes du témoin positif interne (IPC) ont été calculées par rapport au standard qPCR dont la concentration était la plus proche de celle de l'échantillon de ccfDNA amplifié par qPCR afin de déterminer l'ampleur de l'inhibition.

Les résultats de l'essai qPCR (Tableau 4) indiquaient une inhibition de l'amplification minimale ou nulle, comme le montrent les valeurs $|\Delta C_q|$ moyennes de l'IPC $\leq 0,5$ pour tous les échantillons de ccfDNA purifiés.

Tableau 4. Évaluation de l'inhibition par amplification du ccfDNA extrait d'échantillons de 4 ml de plasma humain.

ID échantillon (anticoagulant)	$ \Delta C_q $ moyen de l'IPC
1 (K ₂ EDTA)	0,2
2 (K ₂ EDTA)	0,2
3 (K ₂ EDTA)	0,4
4 (Streck)	0,5
5 (Streck)	0,3
6 (Streck)	0,3

9.C. Quantification du ccfDNA par colorant fluorescent et qPCR

L'homogénéité de la quantification du ccfDNA a été évaluée en comparant les concentrations de ccfDNA selon une méthode à base de colorant fluorescent spécifique de l'ADN à deux brins et avec un essai qPCR avec amplification d'une cible d'ADN de 75 bp. Des échantillons de ccfDNA ont été extraits en quatre exemplaires de chacun des échantillons de 4 ml de plasma humain recueillis chez six personnes dans des tubes avec K₂EDTA ou des Streck Cell-Free DNA BCT®. Les rapports de la quantification du ccfDNA en fonction de la fluorescence sur la quantification du ccfDNA d'après le qPCR ont été calculés.

Les résultats ont démontré une forte corrélation entre les deux méthodes de quantification, avec des rapports de concentration de ccfDNA de 0,7 à 1,4 sur les différents échantillons.

Tableau 5. Comparaison de la concentration en ccfDNA à l'aide de méthodes de quantification par fluorescence et qPCR.

ID échantillon (anticoagulant)	Rapport de concentration fluorescence sur qPCR
1 (K ₂ EDTA)	0,7
2 (K ₂ EDTA)	1,3
3 (K ₂ EDTA)	0,9
4 (Streck)	1,3
5 (Streck)	0,9
6 (Streck)	1,4

9.D. Reproductibilité

La reproductibilité de l'extraction de ccfDNA avec le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit a été évaluée en analysant le pourcentage du coefficient de variation (CV) au sein d'un cycle et entre différents cycles pour le rendement du ccfDNA. En utilisant 4 ml de plasma recueilli dans de l'anticoagulant K₂EDTA, le ccfDNA a été extrait à l'aide de trois cycles d'extraction consécutifs avec les Maxwell® CSC et Maxwell® CSC 48 Instruments. Chaque cycle d'extraction a produit 24 éluats de ccfDNA. Le rendement du ccfDNA a été quantifié à l'aide d'un essai qPCR avec amplification d'une cible d'ADN de 75 bp.

Les résultats indiquaient des CV respectifs de 11 % et 14 % sur un même cycle pour le Maxwell® CSC Instrument et le Maxwell® CSC 48 Instrument. Les CV d'un cycle à l'autre étaient de 5 % pour les deux appareils.

Tableau 6. Variabilité du rendement de ccfDNA au sein d'un cycle et entre différents cycles.

Appareil	Anticoagulant	Volume d'entrée d'échantillon de plasma (ml)	Coefficient de variation sur un même cycle en %	Coefficient de variation entre différents cycles en %
Maxwell® CSC	K ₂ EDTA	4	11 %	5 %
Maxwell® CSC 48	K ₂ EDTA	4	14 %	5 %

9.E. Contamination croisée

Le potentiel de contamination croisée pendant l'extraction de ccfDNA avec le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit a été évalué en traitant des échantillons de plasma humains et bovins placés à diverses positions du plateau des Maxwell® CSC et Maxwell® CSC 48 Instruments. Les éluats de ccfDNA provenant de plasma bovin ont été analysés afin d'évaluer la présence d'éventuel ADN humain contaminant au moyen d'un essai qPCR qui amplifiait une cible d'ADN de 75 bp spécifique de l'humain afin de déterminer une éventuelle contamination croisée.

Lorsque des échantillons de plasma humain ont été traités dans le Maxwell® Instrument à des positions adjacentes à celles d'échantillons de plasma bovin, aucun des éluats de ccfDNA bovin ne présentait de quantités quantifiables d'ADN humain dans l'essai qPCR, ce qui confirmait l'absence de contamination croisée détectable.

9.F. Compatibilité avec le séquençage de nouvelle génération

La compatibilité des éluats de ccfDNA avec les procédés de séquençage de nouvelle génération (NGS) a été évaluée par la préparation de bibliothèques de ccfDNA suivie de l'analyse TapeStation. Le ccfDNA a été extrait d'échantillons de plasma recueillis dans des tubes avec K₂EDTA ou des Streck Cell-Free DNA BCT® avec le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit et le Maxwell® CSC ou le Maxwell® CSC 48 Instrument. Le succès de la préparation de bibliothèques a été déterminé en observant un décalage des paires de bases de l'adaptateur caractéristique dans le cadre de l'analyse TapeStation.

Toutes les bibliothèques de ccfDNA évaluées présentaient le décalage des paires de bases de l'adaptateur attendu, ce qui a confirmé le succès de la préparation des bibliothèques NGS.

9.G. Compatibilité avec la PCR digitale

La compatibilité des éluats de ccfDNA avec le procédé de PCR digitale (dPCR) a été évaluée au moyen d'un essai avec PCR digitale en gouttelettes. Cet essai incluait des échantillons de ccfDNA extraits de plasma humain recueillis dans des tubes avec K₂EDTA et des Streck Cell-Free DNA BCT®, avec des volumes d'entrée d'échantillon de plasma de 3 ml et 4 ml. Les éluats de ccfDNA ont été évalués au moyen d'un essai avec variation du nombre de copies (gène PIK3CA) et les nombres de gouttelettes ont été relevés.

Les résultats démontraient une amplification réussie sur tous les échantillons de ccfDNA testés, avec plus de 15 000 gouttelettes par réaction.

10. Évaluation des performances cliniques

Les performances cliniques du Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit ont été évaluées par un laboratoire clinique externe avec des échantillons de plasma humain traités avec le Maxwell® CSC 48 Instrument.

Lors du premier essai, deux testeurs ont purifié du ccfDNA issu d'échantillons de 1,5 ml de plasma humain (n = 10) de manière indépendante en utilisant le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit et la méthode de purification standard utilisée comme référence par le laboratoire. Les éluats de ccfDNA obtenus ont été analysés afin de déterminer le facteur Rhésus au moyen d'un essai par amplification. Le ccfDNA extrait d'échantillons de plasma humain avec le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit présentait les résultats attendus, concordants avec les résultats obtenus avec le ccfDNA extrait selon la méthode de référence du laboratoire.

Lors du deuxième essai, deux testeurs ont purifié du ccfDNA issu d'échantillons de 1,5 ml de plasma humain (n = 10) de manière indépendante en utilisant le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit. Les éluats de ccfDNA purifiés ont été analysés afin de déterminer le facteur Rhésus au moyen d'un essai par amplification, et des résultats concordants ont été obtenus entre les deux testeurs.

11. Considérations relatives à l'utilisation du ccfDNA

11.A. Préparation du plasma

Un problème potentiel lors de la purification du ccfDNA est la présence d'ADN génomique contaminant issu de globules blancs lysés. Le plasma est généralement centrifugé deux fois : une première fois pour retirer les globules rouges et blancs, et une deuxième pour retirer tout globule blanc résiduel. Si l'échantillon de sang a incubé à température ambiante pendant des périodes prolongées, ou s'il a été congelé et décongelé avant le traitement, des globules blancs ont pu être lysés et libérer de l'ADN génomique dans le plasma.

Si l'échantillon de plasma a été congelé, un cryoprécipité pourrait être présent après la décongélation. Bien que le cryoprécipité n'ait aucun effet sur la purification du ccfDNA avec le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit, il peut affecter le pipetage du plasma. Pour agglomérer le cryoprécipité, centrifugez l'échantillon de plasma à $\geq 1\,000 \times g$ pendant ≥ 5 minutes avant le traitement.

11.B. Recommandations pour la quantification du ccfDNA

La faible concentration et la nature fragmentée du ccfDNA représentent des défis particuliers. Le rendement typique est de 5–30 ng de ccfDNA par millilitre de plasma pour les personnes en bonne santé. La majorité des fragments de ccfDNA sont d'environ 160–200 bp, et certains fragments atteignent environ 340 bp et 510 bp.

Quantification aux UV

Il est difficile de déterminer précisément la concentration de ccfDNA avec une absorbance de 260 nm en raison de la faible concentration. Certains produits utilisent un ARN porteur pour renforcer la purification du ccfDNA. L'ARN porteur est beaucoup plus abondant que le ccfDNA, et permet une copurification. Cela peut fournir une valeur A_{260} incorrecte et des concentrations apparentes de ccfDNA nettement plus élevées. Pour une quantification précise, vous devez utiliser un PCR ou des colorants fluorescents.

Quantification par fluorescence

La grande sensibilité des colorants fluorescents spécifiques de l'ADN à deux brins les rend particulièrement adaptés à la quantification du ccfDNA, mais deux problèmes se posent. Le premier concerne l'ARN porteur. Tandis que les colorants spécifiques de l'ADN à deux brins sont beaucoup plus spécifiques de l'ADN que de l'ARN, les niveaux élevés d'ARN porteur dans d'autres kits de ccfDNA peuvent gonfler les valeurs en unités fluorescentes relatives (RFU), et les concentrations de ccfDNA peuvent sembler beaucoup plus élevées que les concentrations réelles.

Un autre facteur tient aux standards utilisés avec les colorants fluorescents, généralement de l'ADN Lambda ou génomique à poids moléculaire élevé. Le ccfDNA est très fragmenté et a un poids moléculaire relativement faible. Il ne fixe donc pas les colorants fluorescents aussi efficacement que l'ADN à poids moléculaire élevé, si bien que les concentrations paraissent plus faibles. Si possible, utilisez des standards d'ADN avec un poids moléculaire assez faible pour obtenir une quantification plus précise.

Quantification par amplification

La PCR digitale ou les essais qPCR produisent la quantification la plus précise du ccfDNA. Outre la sensibilité, la quantification par amplification peut indiquer l'adéquation des échantillons pour des applications en aval par amplification.

12. 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. E-mail : techserv@promega.com

Symptômes	Causes et commentaires
L'appareil ne peut pas récupérer les plongeurs	Veillez à utiliser un kit de chimie spécifique Maxwell® CSC ; les plongeurs pour les kits Maxwell® CSC sont spécifiques aux Maxwell® Instruments pris en charge (voir Tableau 1).
Faible rendement du ccfDNA	Le Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Kit peut accepter des échantillons de 4 ml de plasma au maximum. Renouvelez l'extraction avec un maximum de 4 ml de plasma. Si vous utilisez moins de 1 ml de plasma, il peut y avoir une incidence négative sur la récupération du ccfDNA. Confirmez que le bon volume de solution de protéinase K (PK2) a été ajouté dans le puits n° 4 de la cartouche. Renouvelez l'extraction après avoir versé 10 µl de solution de protéinase K (PK2) dans le puits n° 4. Les rendements peuvent être réduits si l'élution est réalisée dans moins de 50 µl d'Elution Buffer (RCFD). Renouvelez l'extraction avec 50 µl d'Elution Buffer (RCFD). L'Elution Buffer (RCFD) fourni est essentiel pour une récupération efficace du ccfDNA. Ne remplacez pas l'Elution Buffer (RCFD) par d'autres tampons d'élution. Renouvelez l'extraction avec l'Elution Buffer (RCFD). Confirmez que le plasma a été transféré dans les bons puits de la Maxwell® CSC Rapid ccfDNA Cartridge (voir Tableau 2 et Figure 1 à la Section 6). • Pour des volumes d'entrée de plasma de 1,0–1,5 ml, transférez tout le plasma dans le puits n° 1. • Pour des volumes d'entrée de plasma de 1,5–3,0 ml, divisez le volume de plasma équitablement entre les puits n° 1 et n° 3. • Pour des volumes d'entrée de plasma de 3,0 ml–4,0 ml, ajoutez des volumes égaux de plasma dans les puits n° 1, n° 2 et n° 3.
Contamination par de l'ADN génomique	La préparation de plasma contient des globules blancs lysés. Vous trouverez aux sections 5 et 11.A des recommandations pour la préparation d'échantillons de plasma à partir de sang total.

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.

13. Produits associés

Produit	Taille	Cat. #
Maxwell® CSC Instrument*	1 de chaque	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 de chaque	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 de chaque	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 de chaque	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 de chaque	AS8402
RSC/CSC Plungers	50/pack	AS1331
Elution Tubes (0,5 ml)	50/pack	AS6201
Elution Magnet, 16 positions	1 de chaque	AS4017
Elution Magnet, 24 positions	1 de chaque	AS4018

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

Maxwell® CSC Reagent Kits

Visitez www.promega.com pour une liste des kits d'extraction Maxwell® CSC disponibles.



© 2025 Promega Corporation. Tous droits réservés.

Maxwell est une marque déposée de Promega Corporation.

Cell-Free DNA BCT est une marque déposée de Streck LLC.

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.