

Octobre 2021

Manuel de la trousse *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR Kit



Version 1



Pour une utilisation diagnostique in vitro

Pour une utilisation avec les instruments
Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



870041



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALLEMAGNE



R5 1123966FRCA

Table des matières

Utilisation prévue	5
Résumé et explication du test.....	6
Principe de la procédure	7
Réactifs	10
Matériel fourni.....	13
Contenu de la trousse	13
Matériel nécessaire, mais non fourni	14
Avertissements et précautions	16
Information sur la sécurité.....	16
Précautions générales	16
Conservation et manipulation des réactifs.....	18
Prélèvement des échantillons, préparation pour l'analyse et conservation	20
Préparation des échantillons de tissu de CCR pour l'extraction de l'ADN.....	20
Préparation des échantillons de tissu de CPNPC pour l'extraction de l'ADN	21
Protocole : Extraction de l'ADN	22
Extraction de l'ADN des échantillons de CCR	22
Extraction de l'ADN des échantillons de CPNPC	23
Évaluation des échantillons d'ADN	24
Protocole : Détection des mutations du gène KRAS	37
Interprétation des résultats.....	50
Guide de dépannage.....	52
Indicateurs du progiciel <i>therascreen</i> KRAS Assay Package	53

Contrôle de la qualité.....	56
Limitations.....	56
Les résultats attendus	57
Les caractéristiques des performances pour les échantillons de CCR	58
Les performances analytiques.....	58
Les caractéristiques des performances pour les échantillons de CPNPC	80
Les performances analytiques.....	80
Précision clinique	95
Les performances cliniques.....	104
Références	106
Symboles	108
Coordonnées	109
Annexe : Installation du progiciel <i>therascreen</i> KRAS Assay Package	110
Pour commander	114
Historique des révisions du document.....	116

Utilisation prévue

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est un dosage de PCR en temps réel qualitative utilisé sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM pour la détection de sept mutations somatiques dans l'oncogène KRAS humain à l'aide d'ADN extrait de tissus d'un cancer colorectal (CCR) ou d'un cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC), fixés dans le formaldéhyde et enrobés dans la paraffine (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE). La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit permet d'aider le clinicien à identifier les patients présentant un CCR qui ne peuvent pas recevoir de traitement contre l'EGFR (récepteur de facteur du croissance épidermique), par exemple le panitumumab ou le cétuximab. La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit aide également à identifier les patients atteints d'un CPNPC pour qui un traitement par le sotorasib est indiqué grâce à la détection de la mutation KRAS G12C par le test.

Résumé et explication du test

On observe fréquemment des mutations de l'oncogène KRAS dans les cancers humains (1–4). La présence de ces mutations est en corrélation avec l'absence de réponse à certains traitements anticancéreux inhibiteurs de l'EGFR chez les patients atteints d'un CCR métastatique (5–19).

La mutation KRAS G12C entraîne spécifiquement l'expression d'une forme de la protéine KRas dans laquelle le résidu de glycine en position d'acide aminé 12 est remplacé par un résidu de cystéine. Chez les patients atteints d'un CPNPC, cela indique que le traitement par l'inhibiteur ciblant le KRas, le sotorasib, est potentiellement approprié (Amgen, données consignées au dossier).

En utilisant les technologies Scorpions® et ARMS® (Allele Refractory Mutation System; système de mutation réfractaire des allèles) (20, 21), la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit permet de détecter 7 mutations dans les codons 12 et 13 de l'oncogène KRAS dans le bruit de fond de l'ADN génomique de type sauvage (voir le Tableau 1). Les données de COSMIC (2016 v72) indiquent que les 7 mutations détectées par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit représentent > 95 % de toutes les mutations KRAS signalées chez les patients atteints d'un CCR (21).

Tableau 1. Liste des mutations et des identités de COSMIC*

Mutation	Changement de base	ID de COSMIC
GLY12ALA (G12A)	GGT>GCT	522
GLY12ASP (G12D)	GGT>GAT	521
GLY12ARG (G12R)	GGT>CGT	518
GLY12CYS (G12C)	GGT>TGT	516
GLY12SER (G12S)	GGT>AGT	517
GLY12VAL (G12V)	GGT>GTT	520
GLY13ASP (G13D)	GGC>GAC	532

* Les ID de COSMIC proviennent du *Catalogue of somatic mutations in cancer* (Catalogue des mutations somatiques du cancer) (22) : (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Principe de la procédure

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit contient 8 différentes réactions d'amplification par PCR : 7 réactions spécifiques aux mutations ciblant les codons 12 et 13 de l'exon 2 de l'oncogène KRAS et 1 réaction témoin de type sauvage ciblant l'exon 4. Les principaux composants de la trousse sont décrits ci-dessous.

Mélanges réactionnels des mutations

Chaque réaction spécifique pour une mutation utilise des amorces du système de mutation réfractaire des allèles (Allele Refractory Mutation System; ARMS) qui sont spécifiques pour cette mutation pour amplifier de façon sélective l'ADN muté, ainsi qu'une amorce Scorpions pour détecter le produit d'amplification.

ARMS

L'amplification spécifique aux allèles est réalisée par le biais du système ARMS, qui exploite la capacité de la *Taq* ADN polymérase de différencier une base appariée d'une base mésappariée à l'extrémité 3' d'une amorce de PCR. Lorsque l'amorce est entièrement appariée, l'efficacité de l'amplification est optimale. Lorsque l'extrémité 3' est mésappariée, l'amplification produit uniquement un faible bruit de fond. Par conséquent, une séquence mutée est amplifiée de façon sélective, même dans les échantillons dont la majorité de l'ADN ne contient pas la mutation.

Scorpions

La détection de l'amplification s'effectue par le biais de la technologie Scorpions. Les Scorpions sont des molécules bifonctionnelles contenant une amorce de PCR qui comporte une liaison covalente avec une sonde. La sonde contient le fluorophore carboxyfluorescéine (FAM™) et un suppresseur. Ce dernier supprime la fluorescence du fluorophore. Lorsque la sonde se lie à l'amplicon ARMS pendant la PCR, le fluorophore et le suppresseur sont libérés, entraînant une augmentation de la fluorescence détectable.

Réaction témoin

Le mélange réactionnel des témoins (tube CTRL) utilise une amorce Scorpions et une amorce non marquée pour amplifier une courte séquence de l'exon 4 du gène KRAS. La réaction témoin détermine si une concentration appropriée d'ADN amplifiable est présente dans l'échantillon, une valeur également utilisée dans les calculs analytiques pour déterminer l'état mutationnel.

Témoin interne

Chacun des 8 mélanges réactionnels contient un témoin interne conçu pour détecter tout échec de réaction (p. ex. en raison de la présence d'inhibiteurs). Le témoin interne utilise une séquence cible d'oligonucléotides non apparentée à celle du gène KRAS, une amorce non marquée et une amorce Scorpions marquée à l'hexachloro-fluorescéine (HEXTM) pour la distinguer de l'amorce Scorpions marquée au FAM dans les mélanges réactionnels du témoin et des mutations.

Témoin positif

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit contient également le témoin positif (tube PC) du gène KRAS. Le témoin positif contient un mélange d'oligonucléotides synthétiques représentant chacune des mutations détectées par la trousse. La détection du témoin positif confirme le bon fonctionnement des mélanges réactionnels de la trousse.

Témoin négatif

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit contient de l'eau exempte de nucléase qui doit être utilisée pour la réaction du témoin sans matrice (tube NTC). Le TSM est un témoin négatif utilisé pour détecter toute contamination possible pendant la préparation des dosages.

Taq ADN polymérase

La Taq ADN polymérase est l'enzyme utilisée pour effectuer l'amplification en chaîne par polymérase avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Plateforme et logiciel

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est spécialement conçue pour une utilisation avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. L'instrument Rotor-Gene Q est programmé pour différents paramètres de série d'analyses par le progiciel *therascreen* KRAS Assay Package 3.0.

Le progiciel *therascreen* KRAS Assay Package contient deux matrices : la matrice « *therascreen* KRAS QC Locked Template » (Matrice verrouillée du CQ *therascreen* KRAS pour l'évaluation des échantillons d'ADN) et la matrice « *therascreen* KRAS Locked Template » (pour la détection des mutations KRAS). Ces matrices contiennent les paramètres d'analyse du PCR et calculent les résultats. Les mêmes paramètres d'analyse sont utilisés pour l'évaluation des échantillons d'ADN avec le témoin (tube CTRL) et pour la détection des mutations avec les mélanges réactionnels des mutations :

1. Maintenez la Taq ADN polymérase à 95 °C pendant 15 minutes pour l'activer.
2. Effectuez 40 cycles de PCR de 30 secondes à 95 °C pour la dénaturation, puis maintenez à 60 °C pendant 1 minute pour l'hybridation et l'élongation.

Le cycle de PCR pendant lequel le taux de fluorescence d'une réaction en particulier franchit la valeur seuil prédéfinie par le progiciel *therascreen* KRAS Assay Package correspond à la valeur de C_T .

En utilisant la réaction témoin pour évaluer les échantillons d'ADN, il est possible de déterminer à partir des valeurs de C_T obtenues les échantillons qui contiennent une concentration d'ADN acceptable pour l'analyse et les échantillons qui requièrent une dilution avant leur analyse.

L'évaluation des échantillons à l'aide des mélanges réactionnels spécifiques aux différentes mutations pour déterminer leurs valeurs de C_T respectives permet au progiciel *therascreen* KRAS Assay Package de calculer la valeur de ΔC_T de chaque échantillon à l'aide de l'équation suivante :

$$\Delta C_T = [\text{valeur de } C_T \text{ du dosage de mutation}] - [\text{valeur de } C_T \text{ du dosage de témoin}]$$

Le logiciel du Rotor-Gene Q utilise les valeurs analytiques prédéterminées de C_T et ΔC_T pour déterminer qualitativement l'état mutationnel des échantillons d'ADN et identifier les échantillons qui contiennent chaque mutation*.

* Une tumeur contient rarement plus d'une mutation. Dans ces cas, la mutation produisant la valeur de ΔC_T la plus faible sera identifiée.

Réactifs

Les mélanges réactionnels sont des duplex contenant des réactifs marqués au FAM pour détecter la cible et un témoin interne marqué au HEX. Les réactifs des mélanges réactionnels et du témoin positif contiennent du tampon Tris EDTA (acide éthylènediamine tétraacétique), et le témoin positif contient le porteur d'acides nucléiques ARN Poly(A).

Tableau 2. Les réactifs fournis dans la trousse theascreen KRAS RGQ PCR Kit

Réactif	Ingrédients	
Control Reaction Mix (Mélange réactionnel témoin)	Amorce du témoin non marquée, amorce du témoin Scorpions, amorce du témoin interne non marquée, amorce du témoin interne Scorpions, matrice du témoin interne, désoxyribonucléosides triphosphates, chlorure de magnésium, tampon Tris EDTA et tampon de PCR	2 tubes x 600 µl
12ALA Reaction Mix (Mélange réactionnel 12ALA)	Amorce ARMS pour la mutation 12ALA, amorce Scorpions, amorce du témoin interne non marquée, amorce du témoin interne Scorpions, matrice du témoin interne, désoxyribonucléosides triphosphates, chlorure de magnésium, tampon Tris EDTA et tampon de PCR	1 tube x 600 µl
12ASP Reaction Mix (Mélange réactionnel 12ASP)	Amorce ARMS pour la mutation 12ASP, amorce Scorpions, amorce du témoin interne non marquée, amorce du témoin interne Scorpions, matrice du témoin interne, désoxyribonucléosides triphosphates, chlorure de magnésium, tampon Tris EDTA et tampon de PCR	1 tube x 600 µl
12ARG Reaction Mix (Mélange réactionnel 12ARG)	Amorce ARMS pour la mutation 12ARG, amorce Scorpions, amorce du témoin interne non marquée, amorce du témoin interne Scorpions, matrice du témoin interne, désoxyribonucléosides triphosphates, chlorure de magnésium, tampon Tris EDTA et tampon de PCR	1 tube x 600 µl
12CYS Reaction Mix (Mélange réactionnel 12CYS)	Amorce ARMS pour la mutation 12CYS, amorce Scorpions, amorce du témoin interne non marquée, amorce du témoin interne Scorpions, matrice du témoin interne, désoxyribonucléosides triphosphates, chlorure de magnésium, tampon Tris EDTA et tampon de PCR	1 tube x 600 µl

Suite du tableau à la page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 2. Les réactifs fournis avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (suite)

Réactif	Ingrédients	
12SER Reaction Mix (Mélange réactionnel 12SER)	Amorce ARMS pour la mutation 12SER, amorce Scorpions, amorce du témoin interne non marquée, amorce du témoin interne Scorpions, matrice du témoin interne, désoxyribonucléosides triphosphates, chlorure de magnésium, tampon Tris EDTA et tampon de PCR	1 tube x 600 µl
12VAL Reaction Mix (Mélange réactionnel 12VAL)	Amorce ARMS pour la mutation 12VAL, amorce Scorpions, amorce du témoin interne non marquée, amorce du témoin interne Scorpions, matrice du témoin interne, désoxyribonucléosides triphosphates, chlorure de magnésium, tampon Tris EDTA et tampon de PCR	1 tube x 600 µl
13ASP Reaction Mix (Mélange réactionnel 13ASP)	Amorce ARMS pour la mutation 13ASP, amorce Scorpions, amorce du témoin interne non marquée, amorce du témoin interne Scorpions, matrice du témoin interne, désoxyribonucléosides triphosphates, chlorure de magnésium, tampon Tris EDTA et tampon de PCR	1 tube x 600 µl
KRAS Positive Control (Témoin positif KRAS)	Matrice du témoin, Matrice du 12ALA, Matrice du 12ASP, Matrice du 12ARG, Matrice du 12CYS, Matrice du 12SER, Matrice du 12VAL, Matrice du 13ASP, ARN Poly(A) et tampon Tris EDTA	1 tube x 250 µl
Taq ADN polymérase	Taq polymérase : 50% glycérol/eau	1 tube x 80 µl
Water for NTC (Eau pour TSM)	Eau exempte de nucléase	1 tube x 1,9 ml
Water for sample dilution (Eau pour la dilution des échantillons)	Eau exempte de nucléase	1 tube x 1,9 ml

Plateformes

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est spécialement conçue pour être utilisée avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, installé avec le logiciel du Rotor-Gene Q 2.3 (ou plus récent) et le progiciel *therascreen* KRAS Assay Package version 3.0.3, disponibles par téléchargement sur le site www.qiagen.com.

- Consultez le manuel d'utilisation de l'instrument pour obtenir plus de renseignements sur l'instrument.
- Consultez « Annexe : Installation du progiciel *therascreen* KRAS Assay Package », page 110, pour obtenir les instructions d'installation du progiciel *therascreen* KRAS Assay Package.

L'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM doit être entretenu conformément aux exigences mentionnées dans le manuel d'utilisation de l'instrument.

Matériel fourni

Contenu de la trousse

Trousse <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit				(24)
N° de référence				870041
Nombre de préparations				24
Couleur	Nom	Identification du tube		Volume
Rouge	Control Reaction Mix (Mélange réactionnel témoin)	1	CTRL	2 x 600 µl
Violet	12ALA Reaction Mix (Mélange réactionnel 12ALA)	2	12ALA	600 µl
Orange	12ASP Reaction Mix (Mélange réactionnel 12ASP)	3	12ASP	600 µl
Rose	12ARG Reaction Mix (Mélange réactionnel 12ARG)	4	12ARG	600 µl
Vert	12CYS Reaction Mix (Mélange réactionnel 12CYS)	5	12CYS	600 µl
Jaune	12SER Reaction Mix (Mélange réactionnel 12SER)	6	12SER	600 µl
Gris	12VAL Reaction Mix (Mélange réactionnel 12VAL)	7	12VAL	600 µl
Bleu	13ASP Reaction Mix (Mélange réactionnel 13ASP)	8	13ASP	600 µl
Beige	KRAS Positive Control (Témoin positif KRAS)	9	TP	250 µl
Menthe	<i>Taq</i> ADN polymérase		<i>Taq</i>	80 µl
Blanc	Water for NTC (Eau pour TSM)		TSM	1,9 ml
Blanc	Water for Sample Dilution (Eau pour la dilution des échantillons)		Dil.	1,9 ml
Manuel de la trousse <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (français)				1

Matériel nécessaire, mais non fourni

Lorsque vous manipulez des produits chimiques, vous devez toujours porter un sarrau de laboratoire adapté, des gants jetables et des lunettes de protection. Pour obtenir plus de renseignements, consultez les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes, disponibles auprès du fournisseur du produit.

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps pour 72-Well Rotor (QIAGEN, n° de réf. 981103 ou 981106)
- Tubes de microcentrifugation stériles pour la préparation des mélanges principaux
- Pointes de pipette stériles équipées de dispositifs anti-aérosols
- Marqueur permanent
- Instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM muni de canaux de fluorescence verts et jaunes (détection de FAM et HEX, respectivement)
- Logiciel du Rotor-Gene Q version 2.3 (ou plus récente).

Remarque : Le progiciel *therascreen* KRAS Assay Package est compatible uniquement avec la version de logiciel 2.3 (ou plus récente).

- Le progiciel *therascreen* KRAS Assay Package version 3.0.3
- Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes, bloc en aluminium pour la préparation manuelle de la réaction (QIAGEN, n° de réf. 9018901)
- Pipettes dédiées *
- Pipettes dédiées* (ajustables) pour la préparation des mélanges principaux de PCR
- Pipettes dédiées* (ajustables) pour la distribution de l'ADN matriciel
- Thermomixeur*, incubateur orbital chauffé*, bloc chauffant ou bain-marie* pour une incubation à 56 °C et 90 °C*

* Avant leur utilisation, assurez-vous que les instruments ont bien été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

-
- Centrifugeuse de paillasse* avec rotor pour tubes de 1,5 ml
 - Mélangeur vortex de paillasse*
 - Trousse QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, n° de réf. 60404; voir « DNA extraction », page 22)
 - Xylène
 - Éthanol (96–100 %) †

* Avant leur utilisation, assurez-vous que les instruments ont bien été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

† N'utilisez pas d'alcool dénaturé, qui contient d'autres substances telles que du méthanol ou de la méthyléthylcétone.

Avertissements et précautions

Pour une utilisation diagnostique in vitro.

Destinée à une utilisation professionnelle.

Information sur la sécurité

Lorsque vous manipulez des produits chimiques, vous devez toujours porter un sarrau de laboratoire adapté, des gants jetables et des lunettes de protection. Pour obtenir plus de renseignements, veuillez consulter les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes. Elles sont disponibles en ligne en format PDF pratique et compact sur le site www.qiagen.com/safety, où vous pouvez les trouver, les afficher et les imprimer pour chaque trousse et composant de trousse QIAGEN®.

Précautions générales

- Le test est conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissu fixés dans le formaldéhyde et enrobés dans la paraffine.
- Tout le matériel chimique et biologique est potentiellement dangereux. Les échantillons sont potentiellement infectieux et doivent être traités comme du matériel présentant un risque biologique.
- Mettez au rebut les échantillons et les autres déchets produits par les dosages conformément aux procédures de sécurité locales.
- Les réactifs de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sont dilués de façon optimale. Ne diluez pas les réactifs davantage, car cela pourrait entraîner une baisse des performances. N'utilisez pas des volumes réactionnels (mélange réactionnel + échantillon) inférieurs à 25 µl.
- Les réactifs de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ont été formulés pour être utilisés spécifiquement avec les tests fournis dans la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

- Les réactifs fournis dans la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit doivent être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans la même trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Ne remplacez pas les réactifs de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit et n'échangez pas les réactifs entre différentes trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, car cela pourrait affecter les performances.
- Utilisez uniquement la *Taq* ADN polymérase (tube *Taq*) fournie dans la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Ne la remplacez pas par la *Taq* ADN polymérase d'autres trousse du même type ou différentes, ou par la *Taq* ADN polymérase d'un autre fournisseur.
- Consultez le manuel d'utilisation de l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM pour obtenir plus de renseignements sur les avertissements, les précautions et les procédures.
- N'utilisez pas des composants périmés ou mal conservés.

Remarque : Faites preuve d'extrême prudence pour éviter la contamination des réactifs contenus dans les témoins et les mélanges réactionnels par le matériel synthétique contenu dans le réactif du témoin positif.

Remarque : Utilisez des pipettes individuelles et dédiées pour préparer les mélanges réactionnels et ajouter les réactifs du témoin positif.

Remarque : Effectuez la préparation et la distribution des mélanges réactionnels dans une zone différente de celle utilisée pour l'ajout du témoin positif.

Remarque : N'ouvrez pas l'instrument Rotor-Gene Q avant la fin de l'analyse.

Remarque : N'ouvrez pas les tubes Rotor-Gene Q après la fin de l'analyse.

Remarque : Faites preuve de prudence pour garantir le bon fonctionnement des tests en évitant la saisie incorrecte des noms des échantillons, les erreurs de chargement et les erreurs de pipetage.

Conservation et manipulation des réactifs

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est expédiée sur un lit de glace sèche. Si un composant de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit n'est pas congelé à l'arrivée, si l'emballage extérieur a été ouvert au cours du transport ou si le colis ne contient pas la notice d'emballage, le manuel ou les réactifs, veuillez contacter un centre d'assistance technique de QIAGEN ou un distributeur local (reportez-vous à la quatrième de couverture ou au site www.qiagen.com).

Dès sa réception, la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit doit être conservée à une température comprise entre -30 °C et -15 °C dans un congélateur à température constante et à l'abri de la lumière. Lorsqu'elle est conservée sous les conditions de conservation spécifiée, la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée.

Une fois ouverts, les réactifs peuvent être conservés dans leur emballage d'origine à une température comprise entre -30 °C et -15 °C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. Évitez les cycles répétés de congélation/décongélation. Ne dépassez pas un maximum de six cycles de congélation/décongélation.

Les réactifs doivent être décongelés à température ambiante pendant au moins 1 heure (période maximale de 4,5 heures). Une fois les réactifs prêts à l'emploi, les réactions de PCR peuvent être préparées. Les tubes Rotor-Gene Q qui contiennent les mélanges principaux et l'échantillon d'ADN doivent être chargés immédiatement sur l'instrument Rotor-Gene Q. Le délai entre le début de la préparation des réactions de PCR et l'analyse ne doit pas dépasser :

- 7 heures si elles sont conservées à température ambiante
- 18 heures si elles sont conservées au réfrigérateur (2 °C à 8 °C)

Remarque : Ce délai comprend la préparation et la conservation des réactions de PCR.

Remarque : Les Scorpions (comme pour toutes les molécules marquées avec un fluorophore) retrouvés dans les mélanges réactionnels sont sensibles à la lumière. Gardez les réactifs des témoins et des mélanges réactionnels à l'abri de la lumière afin d'éviter tout photoblanchiment.

Les réactifs de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sont dilués de façon optimale et aucune autre étape de purification ou de traitement n'est nécessaire avant leur utilisation dans le cadre d'une analyse, tel que décrit dans le manuel de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Il convient de porter une attention particulière aux dates d'expiration et aux conditions de conservation imprimées sur la boîte et les étiquettes de tous les composants. N'utilisez pas des composants périmés ou mal conservés.

Prélèvement des échantillons, préparation pour l'analyse et conservation

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est conçue pour être utilisée avec des échantillons d'ADN extraits de tissu tumoral de patients atteints d'un CCR ou d'un CPNPC. Le génotype et le phénotype des tumeurs sont hétérogènes. Les tumeurs présentant une mutation peuvent contenir de l'ADN de type sauvage, et l'histologie peut montrer des zones de tissu non tumoral. Tous les échantillons de tissus doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Préparation des échantillons de tissu de CCR pour l'extraction de l'ADN

- Utilisez le matériel et les méthodes standard pour fixer l'échantillon de tissu dans une solution de formaldéhyde 10 % tamponné à pH neutre et l'enrober dans la paraffine. À l'aide d'un microtome, taillez des coupes sériées de 5 µm dans le bloc de paraffine et placez-les sur des lames de verre.
- Demandez à une personne formée (p. ex. un pathologiste) d'examiner la coupe colorée à l'hématoxyline-éosine (H&E) pour repérer le contenu tumoral et déterminer sa surface. Marquez la lame colorée pour distinguer le tissu tumoral du tissu normal. Utilisez les coupes sériées pour l'extraction de l'ADN.
- Utilisez les coupes dont 20 % ou plus de la surface est du tissu tumoral pour un traitement sans macrodissection (vois ci-dessous).
- Pour les coupes dont moins de 20 % de la surface est du tissu tumoral, effectuez la macrodissection d'une ou plusieurs coupes. Mettez au rebut le tissu non tumoral.
- Pour les coupes dont la surface est inférieure à 4 mm², traitez deux ou plusieurs coupes pour obtenir une surface totale minimum de tissu tumoral de 4 mm² (s'applique aux échantillons avec ou sans macrodissection). Mettez au rebut le tissu non tumoral.
- Retirez l'excès de paraffine du tissu en grattant les lames avec un nouveau scalpel stérile. Remarque : Utilisez des scalpels secs. N'effectuez pas cette étape dans une hotte à flux d'air laminaire ou de laboratoire.

- Grattez les tissus de tumeur des coupes pour les transférer dans des tubes de microcentrifugation en utilisant un nouveau scalpel pour chaque échantillon.

Préparation des échantillons de tissu de CPNPC pour l'extraction de l'ADN

- Utilisez le matériel et les méthodes standard pour fixer l'échantillon de tissu dans une solution de formaldéhyde 10 % tamponné à pH neutre et l'enrober dans la paraffine. À l'aide d'un microtome, taillez des coupes sériées de 5 µm dans le bloc de paraffine et placez-les sur des lames de verre.
- Une personne formée (p. ex. un pathologiste) doit évaluer une coupe colorée à l'hématoxyline-éosine (H&E) pour la présence de tissu tumoral. Utilisez les coupes sériées pour l'extraction de l'ADN.
- Retirez l'excès de paraffine du tissu en grattant les lames avec un nouveau scalpel stérile.

Vous devez étiqueter, manipuler et conserver les échantillons de tissu tumoral, les blocs, les lames, les échantillons et les tubes de microcentrifugation prêts pour l'extraction de manière contrôlée, conformément aux procédures locales.

Conservez les blocs FFPE et toutes les lames à température ambiante. Les lames peuvent être conservées à température ambiante pendant un maximum de 4 semaines avant l'extraction de l'ADN.

L'ADN génomique peut être conservé à des températures comprises entre 2 °C et 8 °C pendant 1 semaine après l'extraction, puis à des températures comprises entre -25 °C et -15 °C pendant un maximum de 8 semaines avant son utilisation.

Protocole : Extraction de l'ADN

Extraction de l'ADN des échantillons de CCR

Utilisez la trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, n° de réf. 60404) en appliquant les modifications au protocole décrites ci-dessous pour la purification de l'ADN génomique des échantillons préparés à partir de tissu CCR FFPE.

Remarque : La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a été validée avec de l'ADN extrait à l'aide de la trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. N'utilisez pas d'autres produits pour l'extraction de l'ADN.

Effectuez l'extraction de l'ADN en suivant les instructions du manuel de la trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit en tenant compte des points suivants :

- Consultez le manuel de la trousse *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* pour la préparation des échantillons avant l'extraction de l'ADN.
- La trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit doit être utilisée uniquement pour un traitement manuel. N'utilisez pas le protocole automatisé pour le QIAcube® décrit dans le manuel de la trousse *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*.
- N'utilisez pas l'étape de la RNase décrite dans le manuel de la trousse *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*.
- N'utilisez pas la solution de déparaffinisation fournie dans la trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit de QIAGEN. Utilisez uniquement la méthode du xylène/éthanol pour la déparaffinisation décrite dans le manuel du *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*.
- La digestion à la protéinase K (étape 11 dans le manuel de la trousse *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*) doit être effectuée pendant une heure.
- Les échantillons doivent être élués dans 200 µl du tampon d'éluion (Buffer ATE) fourni dans la trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Conservez l'ADN génomique à des températures comprises entre 2 °C et 8 °C pendant 1 semaine après l'extraction, puis à des températures comprises entre -25 °C et -15 °C pendant un maximum de 8 semaines avant son utilisation.

Extraction de l'ADN des échantillons de CPNPC

Utilisez la trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, n° de réf. 60404) en appliquant les modifications au protocole décrites ci-dessous pour la purification de l'ADN génomique des échantillons préparés à partir de tissu CPNPC FFPE.

Remarque : La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a été validée avec de l'ADN extrait à l'aide de la trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. N'utilisez pas d'autres produits pour l'extraction de l'ADN.

Effectuez l'extraction de l'ADN en suivant les instructions du manuel de la trousse *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* et en tenant compte des points suivants :

- Utilisez deux coupes de 5 µm par extraction.
- La trousse QIAamp DNA FFPE Tissue Kit doit être utilisée uniquement pour un traitement manuel.
- N'utilisez pas l'étape de la RNase décrite dans le manuel de la trousse *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- N'utilisez pas la solution de déparaffinisation fournie dans la trousse QIAamp DNA FFPE Tissue Kit de QIAGEN. Utilisez uniquement la méthode du xylène/éthanol pour la déparaffinisation décrite dans le manuel de la trousse *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- La digestion à la protéinase K (étape 11 dans le manuel de la trousse *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) doit être effectuée pendant une heure.
- Ajoutez 60 µl du tampon d'élution (ATE) de la trousse QIAamp DNA FFPE Tissue Kit et incubez pendant 2,5 minutes à température ambiante.
- Centrifugez à pleine vitesse pendant 1 minute.

- Ajoutez un autre volume de 60 µl du tampon d'élution (ATE) de la trousse QIAamp DNA FFPE Tissue Kit et incubez pendant 2,5 minutes à température ambiante.
- Centrifugez à pleine vitesse pendant 1 minute.
- Conservez l'ADN génomique à des températures comprises entre 2 °C et 8 °C pendant 1 semaine après l'extraction, puis à des températures comprises entre -25 °C et -15 °C pendant un maximum de 8 semaines avant son utilisation.

Évaluation des échantillons d'ADN

Ce protocole est utilisé pour évaluer la quantité totale d'ADN amplifiable dans les échantillons.

Points importants avant de commencer

Remarque : L'évaluation des échantillons d'ADN n'est pas conçue pour détecter la présence d'inhibiteurs de la PCR, car la quantité totale d'ADN amplifiable dans un échantillon est évaluée en utilisant la réaction témoin.

Remarque : Il est important d'utiliser le mélange réactionnel des témoins tel que décrit ci-dessous pour cette évaluation, et non par spectrophotométrie ou d'autres méthodes. De l'ADN hautement dégradé pourrait ne pas s'amplifier même si les amorces produisent de fragments d'ADN courts.

- Le mélange réactionnel des témoins permet d'évaluer un maximum de 24 échantillons.
- Utilisez le tube CTRL pour évaluer l'ADN avant son analyse.
- Pour une utilisation efficace des réactifs de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, regroupez les échantillons d'ADN autant que possible pour produire des séries d'analyses complètes. L'analyse des échantillons individuellement ou en plus petit nombre requiert plus de réactifs et réduit le nombre total d'échantillons pouvant être analysés avec une seule trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- N'agitez pas la Taq ADN polymérase (Taq) ou tout mélange contenant la Taq ADN polymérase, car cela peut inactiver l'enzyme.

- Pipetez la *Taq* ADN polymérase en plaçant soigneusement la pointe de la pipette juste sous la surface du liquide, pour éviter que l’embout soit recouvert d’une quantité excessive d’enzyme.

Étapes à suivre avant de commencer

- Assurez-vous que le progiciel *therascreen* KRAS Assay Package est installé avant d'utiliser l'instrument Rotor-Gene Q pour la première fois (voir « Appendix: Installation of the *therascreen* KRAS Assay Package », page 110).
- Avant chaque utilisation, tous les réactifs doivent être décongelés complètement pendant au moins 1 heure à température ambiante (15 °C à 25 °C), mélangés en retournant les tubes 10 fois, puis centrifugés brièvement pour recueillir le matériel au fond des tubes.
- Assurez-vous que la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) est à température ambiante (15 °C à 25 °C) avant chaque utilisation. Centrifugez brièvement le tube pour recueillir l'enzyme au fond du tube.

Procédure

1. Décongelez complètement le mélange réactionnel des témoins (tube CTRL), l’eau exempte de nucléase pour le témoin sans matrice (TSM) et le témoin positif du gène KRAS (tube PC) à température ambiante (15 °C à 25 °C) pendant au moins 1 heure. La durée de décongélation des réactifs, la durée de préparation de la PCR et la température de conservation avant le démarrage de la série d’analyses sont indiqués au Tableau 3. Lorsque les réactifs sont décongelés, mélangez-les en retournant chaque tube 10 fois pour éviter les concentrations localisées de sels, puis centrifugez brièvement pour recueillir le matériel au fond des tubes.

Tableau 3. Durées de décongélation, durées de préparation de la PCR et températures de conservation

Durée de décongélation minimale	Durée de décongélation maximale	Température de conservation après la préparation de la PCR	Durée maximale de préparation et de conservation avant la PCR
1 heure	4,5 heures	Température ambiante (15 °C à 25 °C)	7 heures
1 heure	4,5 heures	2 °C à 8 °C	18 heures

Remarque : La préparation de la PCR est effectuée à température ambiante. Le terme « conservation » fait référence au temps écoulé entre la fin de la préparation de la PCR et le démarrage de la série d'analyses de PCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

Remarque : Laissez la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) atteindre la température ambiante (15 °C à 25 °C) en même temps que les autres réactifs (voir « Reagent Storage and Handling », page 18). Centrifugez brièvement le tube pour recueillir l'enzyme au fond du tube.

2. Préparez suffisamment de mélange principal (tube CTRL + *Taq* ADN polymérase [*Taq*]) pour les échantillons d'ADN, une réaction du témoin positif du gène KRAS (tube PC) et 1 tube d'eau exempte de nucléase pour la réaction du témoin sans matrice (tube NTC), en respectant les volumes indiqués au Tableau 4. Ajoutez un volume de réactifs suffisant pour un échantillon supplémentaire, afin d'assurer un surplus suffisant pour la préparation de la PCR.

Le mélange principal contient tous les composants nécessaires pour la PCR, à l'exception de l'échantillon.

Tableau 4. Préparation du mélange principal des témoins

Composant	Volume
Mélange réactionnel des témoins (tube CTRL)	19,76 µl x (n + 1)
<i>Taq</i> ADN polymérase (<i>Taq</i>)	0,24 µl x (n + 1)
Volume total	20,0 µl/réaction

* n = nombre de réactions (échantillons plus témoins). Préparez suffisamment de mélange principal pour un échantillon supplémentaire (n + 1) afin d'assurer un surplus suffisant pour la préparation de la PCR. La valeur de « n » ne doit pas dépasser 24 (plus les témoins) parce que 24 est le nombre maximum d'échantillons par série d'analyse.

Remarque : Lors de la préparation du mélange principal, le volume nécessaire du mélange réactionnel des témoins est ajouté en premier dans les tubes correspondants, et la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) est ajoutée en dernier.

3. Placez le nombre approprié de barrettes de 4 tubes pour PCR (chaque barrette contient 4 tubes) dans le bloc de chargement, selon la disposition présentée au Tableau 5. Ne bouchez pas les tubes.

Remarque : Laissez les bouchons dans le contenant en plastique jusqu'à leur utilisation.

Tableau 5. Disposition des tubes prévue dans le bloc de chargement pour la série d'analyse visant à évaluer les échantillons d'ADN †

Dosage									
Témoin	1 (TP)	9	17	25	–	–	–	–	–
Témoin	2 (TSM)	10	18	26	–	–	–	–	–
Témoin	3	11	19	–	–	–	–	–	–
Témoin	4	12	20	–	–	–	–	–	–
Témoin	5	13	21	–	–	–	–	–	–
Témoin	6	14	22	–	–	–	–	–	–
Témoin	7	15	23	–	–	–	–	–	–
Témoin	8	16	24	–	–	–	–	–	–

† Chaque tube doit contenir un volume réactionnel total de 25 µl (20 µl du mélange principal préparé conformément au Tableau 4, plus 5 µl de TSM/échantillon/TP). Les numéros indiquent la position dans le bloc de chargement et la position finale dans le rotor.

4. Réglez une pipette à un volume inférieur au volume réactionnel total et mélangez bien le mélange principal des témoins en pipettant le volume entier vers le haut et vers le bas à 10 reprises. Ajoutez immédiatement 20 µl du mélange principal des témoins dans chaque barrette de tubes de PCR.
- Remarque : Consultez le Tableau 5 pour connaître la disposition des tubes pendant la préparation des mélanges réactionnels. Pour l'évaluation de l'échantillon d'ADN, le mélange principal des témoins doit être ajouté à 1 tube PC, 1 tube NTC et 1 tube pour chaque échantillon d'ADN.
5. Ajoutez immédiatement 5 µl d'eau exempte de nucléase pour le témoin sans matrice dans le tube NTC (position 2), puis bouchez le tube.
6. Ajoutez 5 µl de chaque échantillon d'ADN dans les tubes d'échantillon (positions 3 à 26), puis bouchez les tubes.
7. Ajoutez 5 µl de témoin positif du gène KRAS dans le tube TP (position 1), puis bouchez le tube. Remarque : † Chaque tube doit contenir un volume réactionnel total de 25 µl (20 µl du mélange principal des témoins + 5 µl de TSM/échantillon/TP).

8. À l'aide d'un marqueur permanent, identifiez les bouchons des tubes se trouvant dans les positions numériques les plus faibles pour chaque barrette de 4 tubes de PCR (p. ex. positions 1, 5 et 9, etc.) pour montrer l'orientation de chargement des tubes dans le rotor à 72 puits de l'instrument Rotor-Gene Q.
9. Retournez les tubes bouchés 4 fois pour mélanger l'échantillon et le mélange réactionnel.
10. Placez toutes les barrettes de 4 tubes de PCR dans les positions correspondantes sur le rotor à 72 puits, en respectant la disposition prévue pour la série d'analyse (Tableau 5) en utilisant les marques pour leur orientation.

Remarque : Si le rotor n'est pas plein, toutes les positions non utilisées dans le rotor doivent être remplies avec des tubes vides et bouchés. Cela garantit l'efficacité thermique de l'instrument Rotor Gene Q.
11. Placez le rotor à 72 puits dans l'instrument Rotor-Gene Q. Vérifiez que la bague de verrouillage (fourni avec l'instrument Rotor-Gene Q) est placé sur la partie supérieure du rotor pour sécuriser les tubes pendant la série d'analyse.
12. Double-cliquez sur l'icône « theascreen KRAS QC Locked Template » (Matrice verrouillée du CQ theascreen KRAS) sur l'écran de l'ordinateur portable branché à l'instrument Rotor-Gene Q pour démarrer le logiciel du Rotor-Gene Q et afficher la matrice (Figure 1).



Figure 1. L'icône « theascreen KRAS QC Locked Template » (Matrice verrouillée du CQ theascreen KRAS).

13. L'onglet « Setup » (Préparation) apparaît par défaut (Figure 2). Vérifiez que la bague de verrouillage est posée correctement, puis cochez la case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage posée). Fermez le capot de l'instrument Rotor-Gene Q.

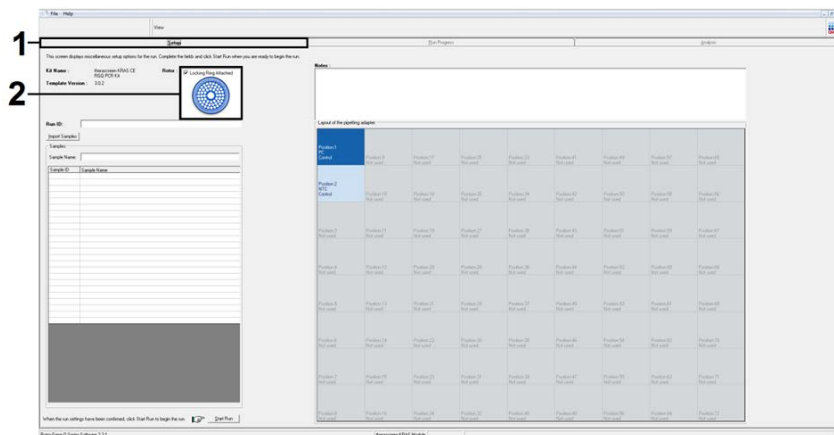


Figure 2. L'onglet « Setup » (Préparation) et la case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage posée).
1 = onglet « Setup » (Préparation), 2 = case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage posée).

14. Saisissez l'identifiant de la série d'analyses dans le champ « Run ID » (Identifiant de la série d'analyses) conformément à votre convention d'identification locale. Saisissez le nom de l'échantillon dans le champ « Sample Name » (Nom de l'échantillon) conformément à votre convention d'identification locale, puis appuyez sur la touche « Return » (Retour). Cette procédure ajoutera le nom de l'échantillon à la liste des échantillons ci-dessous et attribuera un « Sample ID » (Identifiant de l'échantillon) à l'échantillon (1, 2, 3, etc.). De plus, le panneau « Layout of the pipetting adapter » (Disposition de l'adaptateur de pipette) sur le côté droit effectuera une mise à jour pour ajouter le nom de l'échantillon (Figure 3).

Important : Soyez prudent lorsque vous saisissez les noms des échantillons pour éviter de mélanger les identifiants des échantillons. Autrement, les noms des échantillons stockés dans le format *.smp (fichier des échantillons du Rotor-Gene Q) ou *.csv (valeurs séparées par une virgule) peuvent être importés en appuyant sur le bouton « Import Samples » (Importer les échantillons). Les noms des échantillons sont insérés automatiquement en utilisant cette méthode.

Remarque : Dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (Disposition de l'adaptateur de pipette), vérifiez que l'addition du nom de l'échantillon a été surligné par un changement de couleur et que le nom de l'échantillon est situé dans la position correspondante de l'échantillon (Figure 3).

Remarque : Les noms des échantillons comprenant plus de 8 caractères pourraient ne pas être complètement affichés dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (Disposition de l'adaptateur de pipette).

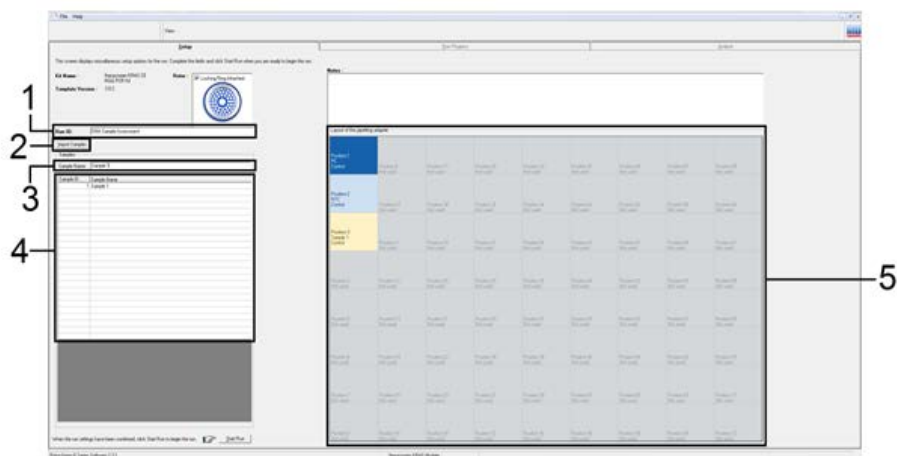


Figure 3. Saisie de « Run ID » (identifiant de la série d'analyses) et « Sample Name » (nom de l'échantillon). 1 = champ de dialogue « Run ID » (ID de la série d'analyses); 2 = « Import Samples » (Importer les échantillons); 3 = champ de dialogue « Sample Name » (Nom de l'échantillon); 4 = « Sample List » (Liste des échantillons); 5 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (Disposition de l'adaptateur de pipette).

15. Répétez l'étape 14 pour saisir les noms de tous les autres échantillons (Figure 4).

Remarque : Pour modifier le nom d'un échantillon, cliquez sur le nom de l'échantillon dans la liste des échantillons, et l'échantillon sélectionné apparaît dans le champ « Sample Name » (Nom de l'échantillon). Modifiez le nom de l'échantillon conformément à votre convention d'identification locale, puis appuyez sur la touche « Return » (Retour) pour effectuer une mise à jour du nom. Le nom des échantillons supplémentaires apparaît dans le panneau **Layout of the pipetting adapter** (Disposition de l'adaptateur de pipette) (5).

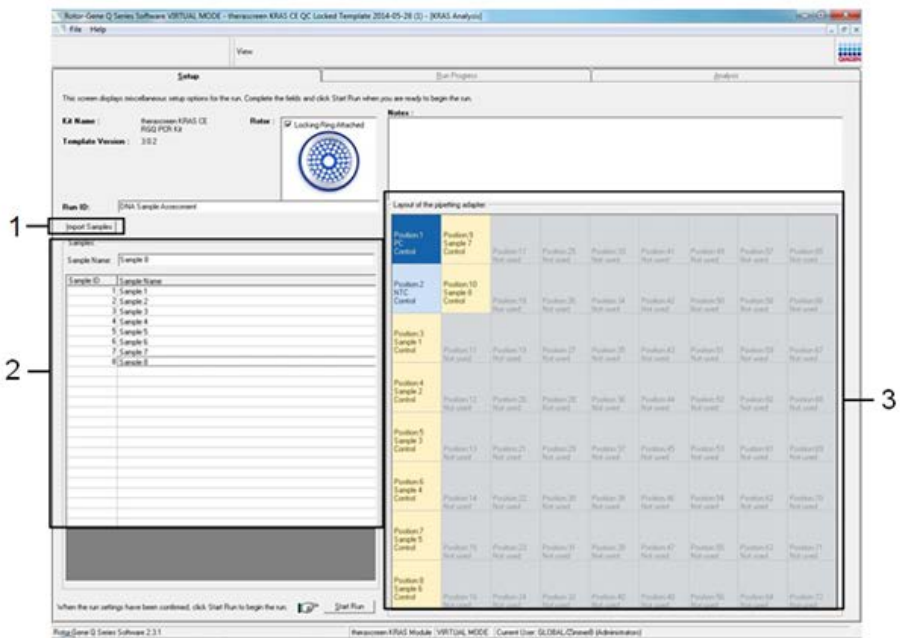


Figure 4. Saisie de nom d'échantillons supplémentaires dans le champ de dialogue « Sample Name » (Nom de l'échantillon). 1 = « Import Samples » (Importer les échantillons); 2 = champ de dialogue « Sample Name » (Nom de l'échantillon) et liste des échantillons; 3 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (Disposition de l'adaptateur de pipette) avec le nom des échantillons supplémentaires.

16. Lorsque le nom de tous les échantillons a été saisi, vérifiez qu'ils sont corrects. Ajoutez toutes les renseignements supplémentaires dans le champ « Notes » (Remarque), si nécessaire, puis cliquez sur « Start Run » (Démarrer la série d'analyses) (Figure 5).
Remarque : Si une position n'est pas utilisée dans le rotor, un message « Warning » (Avertissement) apparaît (Figure 5 et Figure 6) pour rappeler à l'utilisateur que toutes les positions inutilisées dans le rotor doivent être remplies avec un tube vide et bouché. Vérifiez que toutes les positions inutilisées sont remplies avec un tube vide et bouché, puis cliquez sur « OK » pour continuer.

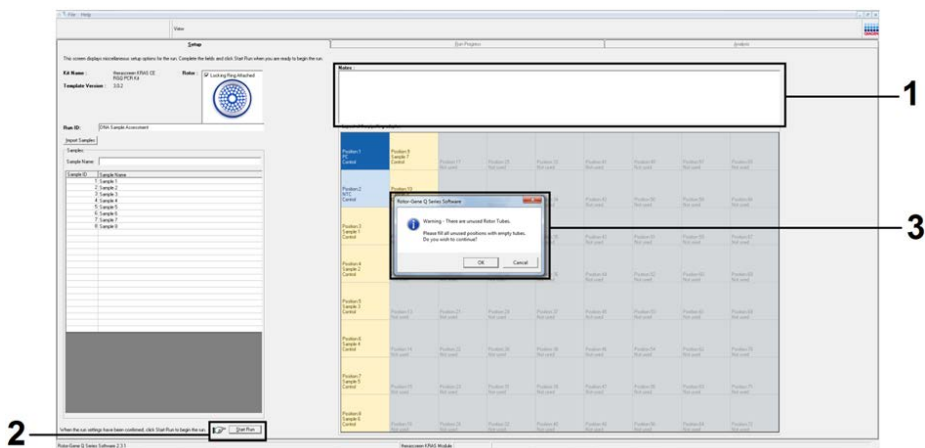


Figure 5. Champ de dialogue « Notes » (Remarque), « Start Run » (Démarrer la série d'analyses) et « Warning » (Avertissement) de positions inutilisées dans le rotor. 1 = champ de dialogue « Notes » (Remarque); 2 = « Start Run » (Démarrer la série d'analyses); 3 = « Warning » (Avertissement) de positions inutilisées dans le rotor.

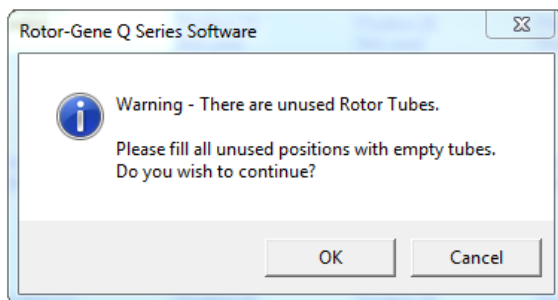


Figure 6. « Warning » (Avertissement) de positions inutilisées dans le rotor. 1 = « Warning of unused rotor positions » (Avertissement de positions inutilisées dans le rotor).

17. Une fenêtre « Save As » (Enregistrer sous) apparaît. Saisissez un nom de fichier approprié et enregistrez le fichier de la série d'analyses de PCR en format *.rex à l'emplacement sélectionné, puis cliquez sur « Save » (Enregistrer) (Figure 7).

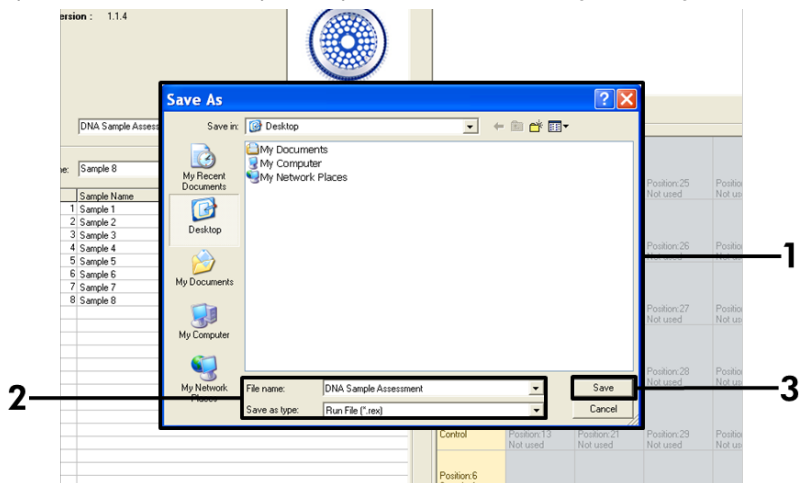


Figure 7. Enregistrement du fichier de la série d'analyses. 1 = fenêtre « Save As » (Enregistrer sous), 2 = « File name and save as type. *.rex file » (Nommer le fichier et enregistrer en format de fichier *.rex); 3 = « Save » (Enregistrer).

18. La série d'analyses de PCR commence.

Remarque : Lorsque la série d'analyses commence, l'onglet « Run Progress » (Progression de la série d'analyses) s'ouvre automatiquement pour afficher la trace de température et le temps d'exécution restant (Figure 8).

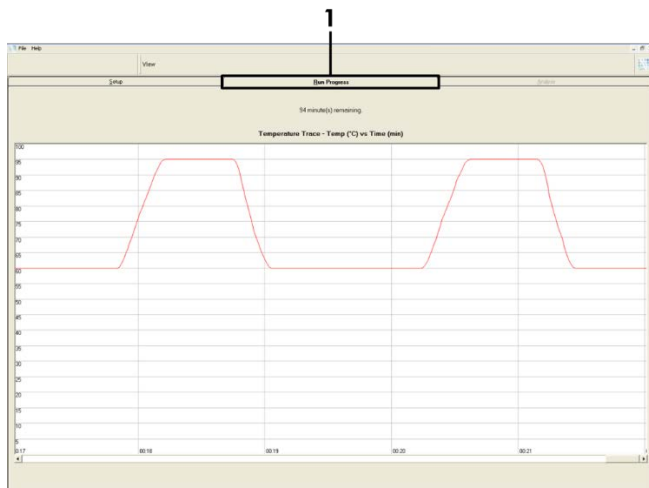


Figure 8. L'onglet « Run Progress » (Progression de la série d'analyses). 1 = onglet « Run Progress » (Progression de la série d'analyses).

19. Une fois la série d'analyses terminée, l'onglet « Analysis » (Analyse) s'ouvre automatiquement

Remarque : Si l'onglet « Analysis » (Analyse) ne s'ouvre pas, cliquez sur l'onglet « Analysis » (Analyse) (Figure 9).

Remarque : Une explication sur la méthode de calcul est présentée à la section « Interprétation des résultats », page 50.

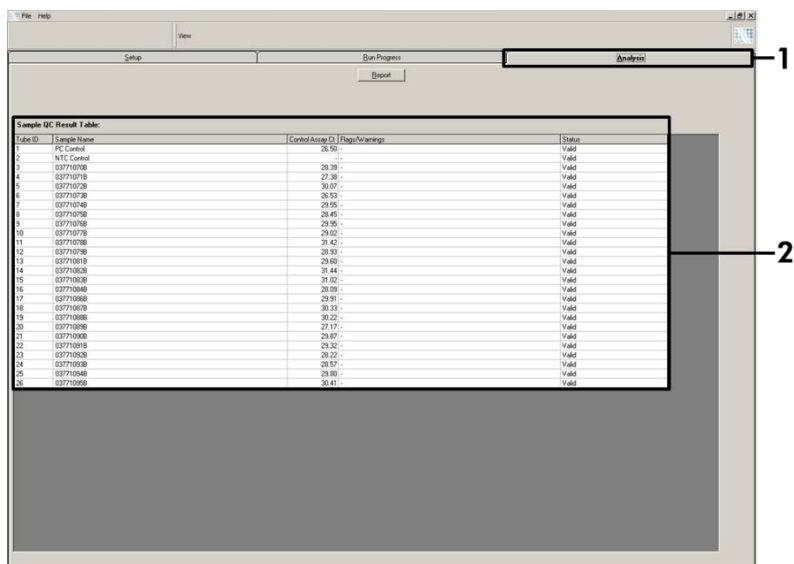


Figure 9. L'onglet « Analysis » (Analyse) et le rapport des résultats. 1 = onglet « Analysis » (Analyse); 2 = « Sample QC Result Table » (Tableau des résultats du CQ des échantillons).

20. Les résultats des témoins seront présentés tel qu'indiqué dans le « Sample QC Result Table » (Tableau des résultats du CQ des échantillons) (Figure 9).

- Les témoins de la série d'analyses (tubes PC et NTC, positions 1 et 2 respectivement) : Si les résultats se situent dans les plages acceptables, chacun affiche « Valid » (Valide), sinon un résultat « Invalid » (non valide) apparaît.
- La valeur de C_T de la réaction témoin de l'échantillon est $>32,00$: un résultat « Invalid » (non valide) s'affiche. La quantité d'ADN n'est pas suffisante pour l'analyse des mutations. Analysez l'échantillon à nouveau. Si la quantité d'ADN est toujours insuffisante, vous devez extraire une quantité supplémentaire d'ADN du tissu tumoral restant, si disponible (voir « Guide de dépannage », page 52).
- La valeur de C_T de la réaction témoin de l'échantillon est $<21,92$: un résultat « Invalid » (non valide) s'affiche. La concentration d'ADN est trop élevée pour l'analyse des mutations. Diluez l'échantillon avec de l'eau exempte de nucléase pour dilution (Dil.) et analysez à nouveau.

Diluez l'échantillon pour obtenir une valeur de C_T comprise entre 21,92 et 32,00.
Une dilution dans un rapport de 1:1 augmente la valeur de C_T d'environ 1,0.

- La valeur de C_T pour la réaction témoin de l'échantillon est comprise entre 21,92 et 32,00 ($21,92 \leq \text{valeur de } C_T \text{ du témoin} \leq 32,00$) : un résultat « Valid » (Valide) s'affiche. La concentration d'ADN est appropriée pour l'analyse des mutations.

Remarque : Si une deuxième extraction ou dilution est nécessaire, répétez la réaction témoin pour confirmer que la concentration d'ADN convient à l'utilisation.

21. Pour générer un fichier de rapport, cliquez sur « Report » (Rapport). La fenêtre « Report Browser » (Navigateur des rapports) apparaît. Sélectionnez « KRAS Analysis Report » (Rapport d'analyse KRAS) sous « Templates » (Matrices), puis cliquez sur « Show » (Afficher) (Figure 10).

Remarque : Les rapports peuvent être enregistrés ailleurs dans le format des archives Web en cliquant sur le bouton « Save As » (Enregistrer sous) dans le coin supérieur gauche de chaque rapport.

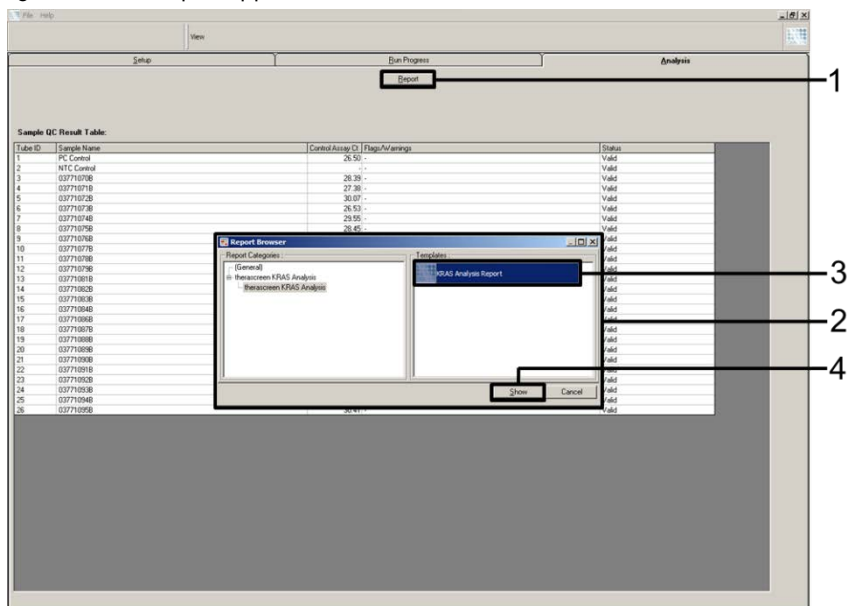


Figure 10. Sélection du « KRAS Analysis Report » (Rapport d'analyse KRAS) 1 = « Report » (Rapport); 2 = fenêtre « Report Browser » (Navigateur des rapports); 3 = sélection du « KRAS Analysis Report » (Rapport d'analyse KRAS), 4 = « Show » (Afficher).

Protocole : Détection des mutations du gène KRAS

Ce protocole est utilisé pour la détection des mutations du gène KRAS.

Points importants avant de commencer

- Un échantillon peut être analysé en utilisant les dosages des mutations du gène KRAS après sa validation.
- Pour une utilisation efficace de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, les échantillons doivent être regroupés en lots de 7 échantillons (pour remplir le rotor à 72 puits) Des lots plus petits signifient que moins d'échantillons pourront être testés avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- L'échantillon doit être testé en utilisant tous les mélanges réactionnels fournis dans la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- N'agitez pas la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) ou tout mélange contenant la *Taq* ADN polymérase, car cela peut inactiver l'enzyme.
- Pipetez la *Taq* ADN polymérase en plaçant soigneusement la pointe de la pipette juste sous la surface du liquide, pour éviter que l'embout soit recouvert d'une quantité excessive d'enzyme.

Étapes à suivre avant de commencer

- Avant chaque utilisation, tous les réactifs doivent être décongelés complètement pendant au moins 1 heure à température ambiante (15 °C à 25 °C), mélangés en retournant les tubes 10 fois, puis centrifugés brièvement pour recueillir le matériel au fond des tubes.
- Assurez-vous que la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) est à température ambiante (15 °C à 25 °C) avant chaque utilisation. Centrifugez brièvement le tube pour recueillir l'enzyme au fond du tube.

Procédure

1. Décongelez complètement tous les tubes de mélange réactionnel, l’eau exempte de nucléase pour le témoin sans matrice et le témoin positif du gène KRAS à température ambiante (15 °C à 25 °C) pendant au moins 1 heure. La durée de décongélation des réactifs, la durée de préparation de la PCR et la température de conservation avant le démarrage de la série d’analyses sont indiqués au Tableau 6. Lorsque les réactifs sont décongelés, mélangez-les en retournant chaque tube 10 fois pour éviter les concentrations localisées de sels, puis centrifugez brièvement pour recueillir le matériel au fond des tubes.

Tableau 6. Durées de décongélation, durées de préparation de la PCR et températures de conservation

Durée de décongélation minimale	Durée de décongélation maximale	Température de conservation après la préparation de la PCR	Durée maximale de préparation et de conservation avant la PCR
1 heure	4,5 heures	Température ambiante (15 °C à 25 °C)	7 heures
1 heure	4,5 heures	2 °C à 8 °C	18 heures

Remarque : La préparation de la PCR est effectuée à température ambiante. Le terme « conservation » fait référence au temps écoulé entre la fin de la préparation de la PCR et le démarrage de la série d’analyses de PCR sur l’instrument Rotor-Gene Q.

Remarque : Laissez la Taq ADN polymérase (Taq) atteindre la température ambiante (15 °C à 25 °C) en même temps que les autres réactifs (voir « Conservation et manipulation des réactifs », page 18). Centrifugez brièvement le tube pour recueillir l’enzyme au fond du tube.

Lorsque les réactifs sont décongelés, mélangez-les en retournant chaque tube 10 fois pour éviter les concentrations localisées de sels, puis centrifugez brièvement pour recueillir le matériel au fond des tubes.

2. Étiquetez 8 tubes de microcentrifugation (étiquettes non fournies) conformément au mélange réactionnel indiqué au Tableau 7. Préparez suffisamment de mélanges principaux (mélanges réactionnels des témoins et des mutations [CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL ou 13ASP] et de Taq ADN polymérase [Taq]) pour les échantillons d’ADN, une réaction du témoin positif KRAS (tube PC) et 1 tube d’eau exempte de nucléase pour la réaction du témoin sans matrice (tube NTC), en respectant les volumes indiqués au Tableau 7. Ajoutez un volume de réactifs suffisant pour un échantillon supplémentaire, afin d’assurer un surplus suffisant pour la préparation de la PCR.

Les mélanges principaux contiennent tous les composants nécessaires pour la PCR, à l'exception de l'échantillon.

Tableau 7. Préparation des mélanges principaux des dosages*

Dosage	Tube de mélange réactionnel	Volume du mélange réactionnel	Volume de <i>Taq</i> ADN polymérase (<i>Taq</i>)
Témoin	CTRL	19,76 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n+1)$
12ALA	12ALA	19,76 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n+1)$
12ASP	12ASP	19,76 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n+1)$
12ARG	12ARG	19,76 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n+1)$
12CYS	12CYS	19,76 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n+1)$
12SER	12SER	19,76 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n+1)$
12VAL	12VAL	19,76 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n+1)$
13ASP	13ASP	19,76 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n+1)$

* n = nombre de réactions (échantillons d'ADN plus témoins). Préparez un volume suffisant pour un échantillon supplémentaire (n + 1) afin d'assurer un surplus suffisant pour la préparation de la PCR. La valeur de « n » ne doit pas dépasser 7 (plus les témoins) parce que 7 est le nombre maximum d'échantillons par série d'analyse.

Remarque : Lors de la préparation du mélange principal, le volume nécessaire du mélange réactionnel des témoins ou des mutations est ajouté en premier dans les tubes correspondants, et la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) est ajoutée en dernier.

- Placez le nombre approprié de barrettes de 4 tubes pour PCR (chaque barrette contient 4 tubes) dans le bloc de chargement, selon la disposition présentée au Tableau 8. Les numéros indiquent la position dans le bloc de chargement et la position finale dans le rotor. Ne bouchez pas les tubes.

Remarque : Laissez les bouchons dans le contenant en plastique jusqu'à leur utilisation.

- Régalez une pipette à un volume inférieur au volume réactionnel total et mélangez bien les mélanges principaux en pipettant le volume entier vers le haut et vers le bas à 10 reprises. Ajoutez immédiatement 20 μl du mélange principal correspondant dans chaque barrette de tubes de PCR.

Remarque : Consultez le Tableau 8 pour connaître la disposition des tubes pendant la préparation des mélanges réactionnels. Pour la détection des mutations du gène KRAS, les mélanges principaux doivent être ajoutés à 8 tubes PC, 8 tubes NTC et 8 tubes pour chaque échantillon d'ADN.

Tableau 8. Disposition des tubes prévue dans le bloc de chargement pour la série d'analyse visant à détecter les mutations du gène KRAS*

Dosage	Témoins		Nombre d'échantillons						
	TP	TSM	1	2	3	4	5	6	7
Témoïn	1	9	17	25	33	41	49	57	65
12ALA	2	10	18	26	34	42	50	58	66
12ASP	3	11	19	27	35	43	51	59	67
12ARG	4	12	20	28	36	44	52	60	68
12CYS	5	13	21	29	37	45	53	61	69
12SER	6	14	22	30	38	46	54	62	70
12VAL	7	15	23	31	39	47	55	63	71
13ASP	8	16	24	32	40	48	56	64	72

* Chaque tube doit contenir un volume réactionnel total de 25 µl (20 µl du mélange principal préparé conformément au Tableau 7, plus 5 µl de TSM/échantillon/TP). Les numéros indiquent la position dans le bloc de chargement et la position finale dans le rotor.

- Ajoutez immédiatement 5 µl d'eau exempte de nucléase pour le témoin sans matrice (TSM) dans les tubes NTC (positions 9 à 16), puis bouchez les tubes.
- Ajoutez 5 µl de chaque échantillon d'ADN dans les tubes d'échantillon (positions 17 à 72), puis bouchez les tubes.
- Ajoutez 5 µl de témoin positif (TP) du gène KRAS dans les tubes TP (positions 1 à 8), puis bouchez les tubes.
- À l'aide d'un marqueur permanent, identifiez les bouchons des tubes se trouvant dans les positions numériques les plus faibles pour chaque barrette de 4 tubes de PCR (p. ex. positions 1, 5 et 9, etc.) pour montrer l'orientation de chargement des tubes dans le rotor à 72 puits de l'instrument Rotor-Gene Q.
- Retournez les tubes bouchés 4 fois pour mélanger l'échantillon et le mélange réactionnel.
- Placez toutes les barrettes de 4 tubes de PCR dans les positions correspondantes sur le rotor à 72 puits, en respectant la disposition prévue pour la série d'analyse (Tableau 8) en utilisant les marques pour leur orientation.

Remarque : Un maximum de 7 échantillons peut être analysé par série d'analyses de PCR. Si le rotor n'est pas plein, toutes les positions non utilisées dans le rotor doivent être remplies avec des tubes vides et bouchés. Cela garantit l'efficacité thermique de l'instrument Rotor-Gene Q.

11. Placez le rotor à 72 puits dans l'instrument Rotor-Gene Q. Vérifiez que l'anneau de verrouillage (fourni avec l'instrument Rotor-Gene Q) est placé sur la partie supérieure du rotor pour sécuriser les tubes pendant la série d'analyse.
12. Double-cliquez sur l'icône « theascreen KRAS Locked Template » (Matrice verrouillée du CQ theascreen KRAS) sur l'écran de l'ordinateur portable branché à l'instrument Rotor-Gene Q pour démarrer le logiciel du Rotor-Gene Q et afficher la matrice en même temps (Figure 11).



Figure 11. L'icône « theascreen KRAS Locked Template » (Matrice verrouillée du theascreen KRAS).

13. L'onglet « Setup » (Préparation) apparaît par défaut (Figure 12). Vérifiez que la bague de verrouillage est posée correctement, puis cochez la case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage posée). Fermez le capot de l'instrument Rotor-Gene Q.

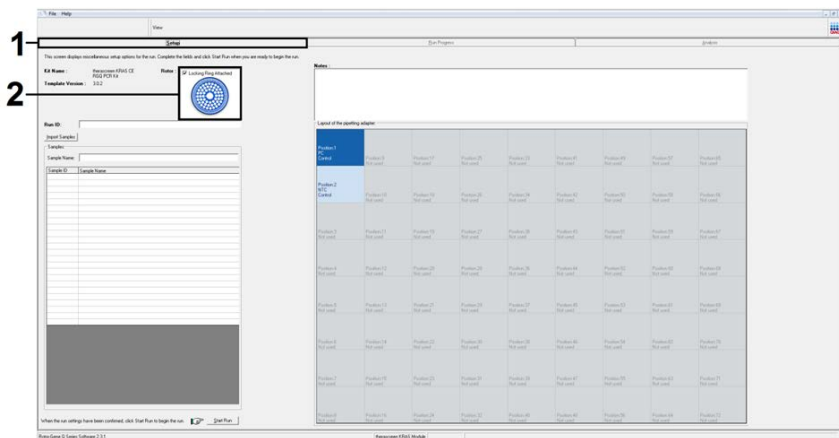


Figure 12. L'onglet « Setup » (Préparation) et la case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage posée). 1 = onglet « Setup » (Préparation), 2 = case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage posée).

14. Saisissez l'identifiant de la série d'analyses dans le champ « Run ID » (Identifiant de la série d'analyses) conformément à votre convention d'identification locale. Saisissez le nom de l'échantillon dans le champ « Sample Name » (Nom de l'échantillon) conformément à votre convention d'identification locale, puis appuyez sur la touche « Return » (Retour).

Important : Soyez prudent lorsque vous saisissez les noms des échantillons pour éviter de mélanger les identifiants des échantillons. Cette procédure ajoutera le nom de l'échantillon à la liste des échantillons ci-dessous et attribuera un « Sample ID » (Identifiant de l'échantillon) à l'échantillon (1, 2, 3, etc.). De plus, le panneau « Layout of the pipetting adapter » (Disposition de l'adaptateur de pipette) sur le côté droit effectuera une mise à jour pour ajouter le nom de l'échantillon (Figure 13).

Sinon, les noms des échantillons stockés dans le format *.smp (fichier des échantillons du Rotor-Gene Q) ou *.csv (valeurs séparées par une virgule) peuvent être importés en appuyant sur le bouton « Import Samples » (importer les échantillons). Les noms des échantillons sont insérés automatiquement en utilisant cette méthode.

Remarque : Dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (Disposition de l'adaptateur de pipette), vérifiez que l'addition du nom de l'échantillon a été surligné par un changement de couleur et que les 8 dosages sont surlignés dans la colonne sous le cercle de l'échantillon (Figure 13).

Remarque : Un maximum de 7 échantillons peut être ajouté. Les identifiants des échantillons (dans le cercle des échantillons) sont attribués automatiquement de 1 à 7.

Remarque : Les noms des échantillons comprenant plus de 8 caractères pourraient ne pas être complètement affichés dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (Disposition de l'adaptateur de pipette).

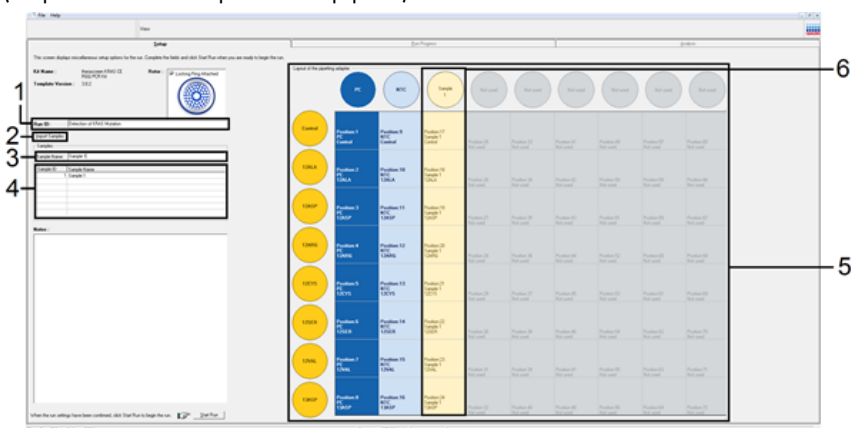


Figure 13. Saisie de « Run ID » (identifiant de la série d'analyses) et « Sample Name » (nom de l'échantillon). 1 = champ de dialogue « Run ID » (identifiant de la série d'analyses); 2 = « Import Samples » (Importer les échantillons); 3 = champ de dialogue « Sample Name » (Nom de l'échantillon); 4 = « Sample List » (Liste des échantillons); 5 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (Disposition de l'adaptateur de pipette); 6 = Le cercle de l'échantillon et la colonne des 8 dosages ci-dessous sont surlignés.

15. Répétez l'étape 14 pour saisir les noms de tous les autres échantillons (Figure 14).

Remarque : Pour modifier le nom d'un échantillon, cliquez sur le nom de l'échantillon dans la liste des échantillons et l'échantillon sélectionné apparaît dans le champ « Sample Name » (Nom de l'échantillon) ci-dessus. Modifiez le nom de l'échantillon conformément à votre convention d'identification locale, puis appuyez sur la touche « Return » (Retour) pour effectuer une mise à jour du nom.



Figure 14. Saisie de nom d'échantillons supplémentaires dans le champ de dialogue « Sample Name » (Nom de l'échantillon). 1 = « Sample Name » (nom de l'échantillon); 2 = « Sample List » (Liste des échantillons); 3 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (Disposition de l'adaptateur de pipette) avec le nom des échantillons supplémentaires.

16. Lorsque le nom de tous les échantillons a été saisi, vérifiez qu'ils sont corrects. Ajoutez toutes les renseignements supplémentaires dans le champ « Notes » (Remarque), si nécessaire, puis cliquez sur « Start Run » (Démarrer la série d'analyses) (Figure 15).

Remarque : Si une position n'est pas utilisée dans le rotor, un message « Warning » (Avertissement) apparaît (Figure 15 et Figure 16) pour rappeler à l'utilisateur que toutes les positions inutilisées dans le rotor doivent être remplies avec un tube vide et bouché. Vérifiez que toutes les positions inutilisées sont remplies avec un tube vide et bouché, puis cliquez sur « OK » pour continuer.

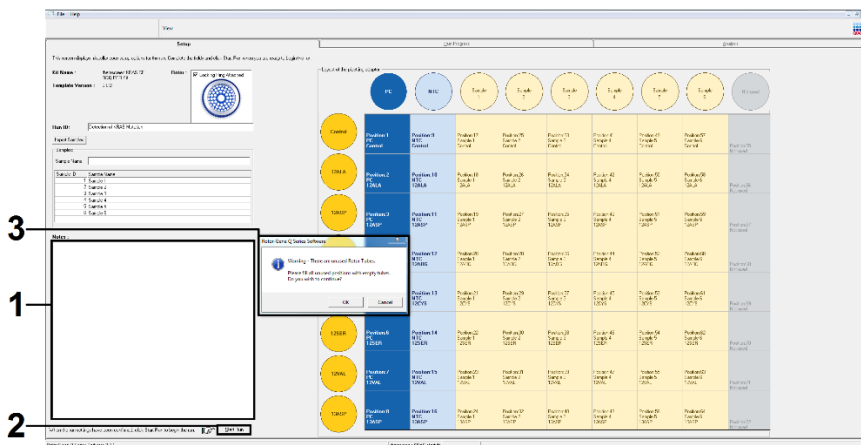


Figure 15. Le champ de dialogue « Notes » (Remarque), le bouton « Start Run » (Démarrer la série d'analyses) et le message « Warning » (Avertissement) de positions inutilisées dans le rotor. 1 = champ de dialogue « Notes » (Remarque); 2 = « Start Run » (Démarrer la série d'analyses); 3 = « Warning » (Avertissement) de positions inutilisées dans le rotor.

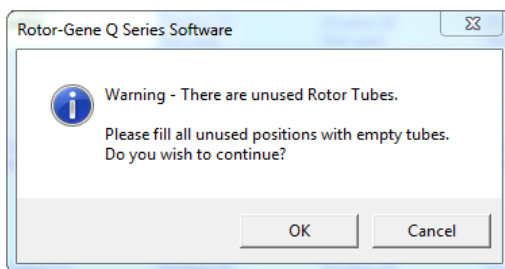


Figure 16. « Warning » (Avertissement) de positions inutilisées dans le rotor. 1 = « Warning of unused rotor positions » (Avertissement de positions inutilisées dans le rotor).

17. Une fenêtre « Save As » (Enregistrer sous) apparaît. Saisissez un nom de fichier approprié et enregistrez le fichier de la série d'analyses de PCR en format *.rex à l'emplacement sélectionné (Figure 17).

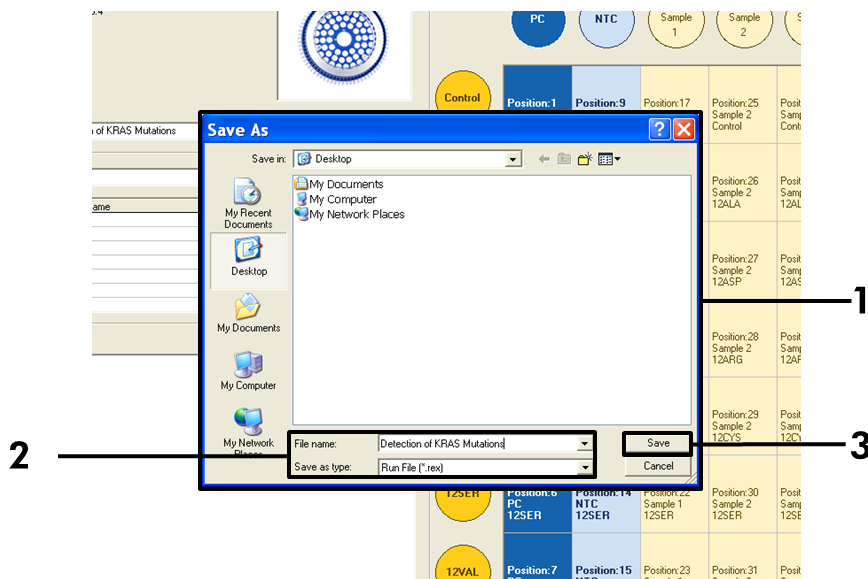


Figure 17. Enregistrement du fichier de la série d'analyses. 1 = fenêtre « Save As » (Enregistrer sous), 2 = « File name and save as type. *.rex file » (Nommer le fichier et enregistrer en format de fichier *.rex); 3 = « Save » (Enregistrer).

18. La série d'analyses de PCR commence.

Remarque : Lorsque la série d'analyses commence, l'onglet « Run Progress » (Progression de la série d'analyses) s'ouvre automatiquement pour afficher la trace de température et le temps d'exécution restant (Figure 18).

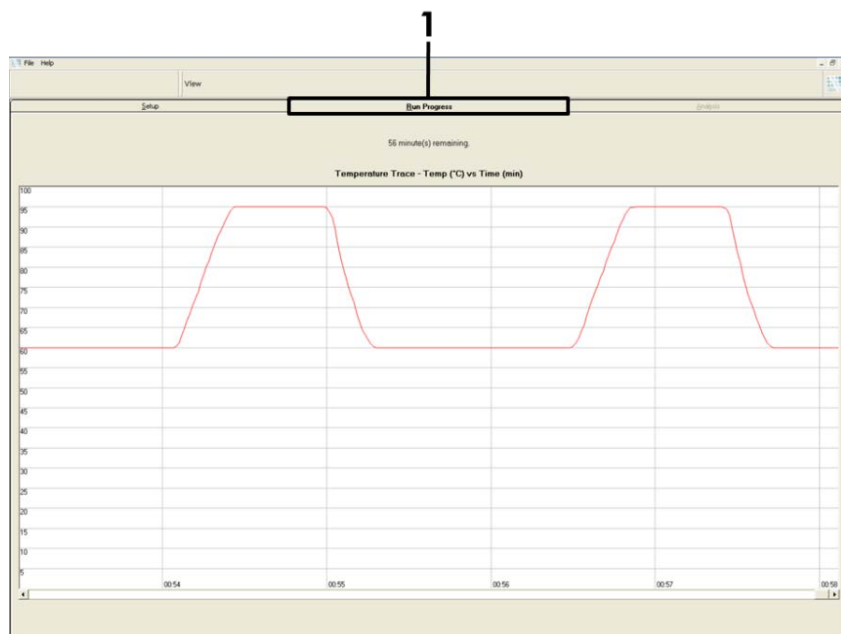


Figure 18. L'onglet « Run Progress » (Progression de la série d'analyses).

19. Une fois la série d'analyses terminée, l'onglet « Analysis » (Analyse) s'ouvre automatiquement

Remarque : Si l'onglet « Analysis » (Analyse) ne s'ouvre pas, cliquez sur l'onglet « Analysis » (Analyse) (Figure 19).

Remarque : Une explication sur la méthode de calcul est présentée à la section « Interprétation des résultats », page 50.

1 = onglet « Analysis » (Analyse); 2 = panneau « Run Controls, Positive Control » (Analyse des témoins, témoin positif); 3 = panneau « Run Controls, Negative Control » (Analyse des témoins, témoin négatif); 4 = « Sample Result Table » (Tableau des résultats sur l'échantillon); 5 = colonne « KRAS Mutation Status » (État mutationnel du gène KRAS).

Run Position	Assay	Flags/Warnings	Positive Control Status
1	Control	-	Valid
2	12ALA	-	Valid
3	12ASP	-	Valid
4	12AFS	-	Valid
5	12CYS	-	Valid
6	12SER	-	Valid
7	12VAL	-	Valid
8	12ASP	-	Valid

Run Position	Assay	NTC	Internal Control	Flags/Warnings	Negative Control Status
9	Control	Valid	Valid	-	Valid
10	12ALA	Valid	Valid	-	Valid
11	12ASP	Valid	Valid	-	Valid
12	12AFS	Valid	Valid	-	Valid
13	12CYS	Valid	Valid	-	Valid
14	12SER	Valid	Valid	-	Valid
15	12VAL	Valid	Valid	-	Valid
16	12ASP	Valid	Valid	-	Valid

Sample ID	Sample Name	KRAS Status	Flags/Warnings	KRAS Mutation Status
1	0377107B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
2	0377107B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
3	0377107B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
4	0377107B	Mutation Positive	-	12ASP Detected
5	0377107B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
6	0377107B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
7	0377107B	Mutation Positive	-	12ASP Detected

Figure 19. L'onglet « Analysis » (Analyse) et le rapport des résultats. 1 = onglet « Analysis » (Analyse); 2 = panneau « Run Controls, Positive Control » (Analyse des témoins, témoin positif); 3 = panneau « Run Controls, Negative Control » (Analyse des témoins, témoin négatif); 4 = « Sample Result Table » (Tableau des résultats sur l'échantillon); 5 = colonne « KRAS Mutation Status » (État mutationnel du gène KRAS).

20. Les résultats des analyses seront présentés tel qu'indiqué ci-dessous (Figure 19).

- Le panneau « Run Controls, Positive Control » (Analyse des témoins, témoin positif). Si les résultats se situent dans les plages acceptables, « Positive Control Status » (État du témoin positif) affichera « Valid » (Valide), sinon un résultat « Invalid » (non valide) apparaît.
- Le panneau « Run Controls Negative Control » (Analyse des témoins, témoin négatif). Si les résultats des colonnes « NTC » (TSM) et « Internal Control » (Témoin interne) se situent dans les plages acceptables, la colonne « Negative Control Status » (État du témoin négatif) affiche « Valid » (Valide), sinon un résultat « Invalid » (non valide) apparaît.
- Le panneau « Sample Result Table » (Tableau des résultats sur l'échantillon). Les mutations spécifiques seront signalées pour les échantillons « Mutation Positive » (Mutant-positifs) dans la colonne « KRAS Mutation Status » (État mutationnel du gène KRAS).

21. Pour générer un fichier de rapport, cliquez sur « Report » (Rapport). La fenêtre « Report Browser » (Navigateur des rapports) apparaît. Sélectionnez « KRAS Analysis Report » (Rapport d'analyse KRAS) sous « Templates » (Matrices), puis cliquez sur « Show » (Afficher) (Figure 20).

Remarque : Les rapports peuvent être enregistrés ailleurs dans le format des archives Web en cliquant sur le bouton « Save As » (Enregistrer sous) dans le coin supérieur gauche de chaque rapport.

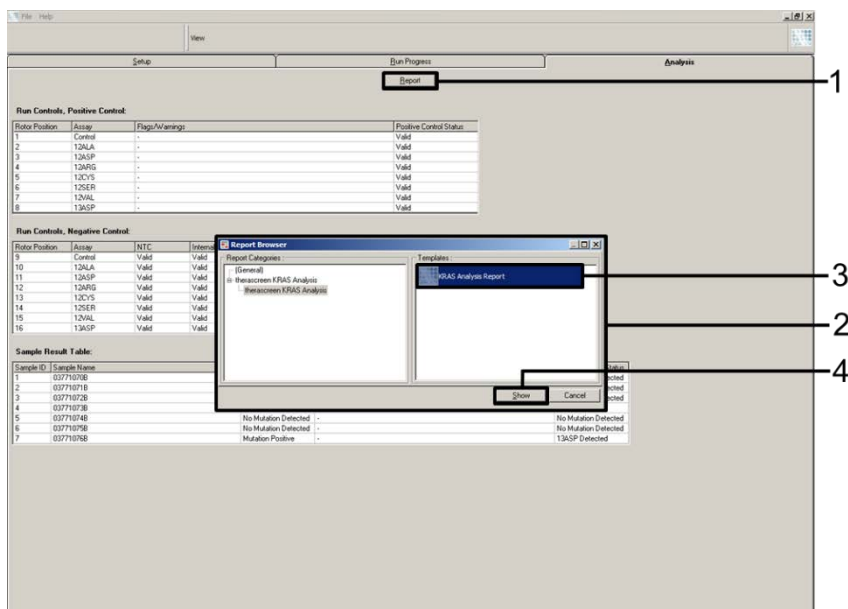


Figure 20. Sélection du « KRAS Analysis Report » (Rapport d'analyse KRAS). 1 = bouton « Report » (Rapport); 2 = fenêtre « Report Browser » (Navigateur de rapports); 3 = sélection du « KRAS Analysis Report » (Rapport d'analyse KRAS), 4 = « Show » (Afficher).

Interprétation des résultats

L'analyse et les appels des mutations sont effectués automatiquement par le progiciel *therascreen* KRAS Assay Package lorsqu'une série d'analyses est terminée. Les renseignements suivants expliquent comment le progiciel *therascreen* KRAS Assay Package effectue l'analyse et l'appel des mutations.

Le cycle de PCR pendant lequel le taux de fluorescence d'une réaction en particulier franchit une valeur seuil correspond à la valeur de C_T . Les valeurs de C_T indiquent la concentration initiale d'ADN dans une réaction. Des valeurs de C_T faibles indiquent des concentrations initiales d'ADN plus élevées, alors que des valeurs élevées de C_T indiquent des concentrations initiales d'ADN plus faibles. Les réactions qui obtiennent une valeur de C_T sont classées positifs pour une amplification.

Le logiciel Rotor-Gene Q interpole l'intensité des signaux de fluorescence entre 2 valeurs enregistrées. Par conséquent, les valeurs de C_T peuvent être n'importe quel chiffre réel (non limité aux chiffres entiers) dans la plage de 0 à 40.

Pour la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, la valeur seuil est fixée à 0,05 unité relative de fluorescence. Cette valeur est configurée dans le progiciel *therascreen* KRAS Assay Package pour les canaux vert et jaune. La valeur seuil a été définie lors du développement de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Un calcul est effectué pour déterminer la valeur de ΔC_T à l'aide de l'équation :

$$\Delta C_T = [\text{valeur de } C_T \text{ du dosage de mutation}] - [\text{valeur de } C_T \text{ du dosage de témoin}]$$

Les témoins de la série d'analyses (témoin positif, TSM et témoin interne) sont évalués pour s'assurer que les valeurs de C_T sont acceptables et que les réactions ont été effectuées avec succès.

Les valeurs de ΔC_T de l'échantillon sont calculées sur la base de la différence entre le C_T du dosage de mutation et le C_T du dosage du témoin du même échantillon. On estime que les échantillons sont mutant-positifs si leur valeur de ΔC_T est inférieure à la valeur de ΔC_T de séparation de ce dosage. Une valeur plus élevée pourrait indiquer que l'échantillon contient un pourcentage de mutation inférieur au seuil de détection de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (au-delà de la limite des dosages) ou qu'il ne contient aucune mutation, ce qui serait signalé comme étant « No Mutation Detected » (Aucune mutation détectée).

L'absence d'amplification des réactions de mutation sera signalée comme étant « No Mutation Detected » (Aucune mutation détectée). ΔI est attendu que les valeurs de C_T calculées à partir de l'amplification du bruit de fond seront supérieures aux valeurs de ΔC_T de séparation, et que l'échantillon sera classé comme étant « No Mutation Detected » (Aucune mutation détectée).

Le résultat de chaque dosage est affiché comme étant « Mutation Positive » (Mutant-positif), « No Mutation Detected » (Aucune mutation détectée), « Invalid » (non valide) ou, si une réaction témoin de la série d'analyse échoue, « Run Control Failed » (Échec d'un témoin de la série d'analyses). Pour les échantillons mutant-positifs, les mutations spécifiques seront signalées. Les autres résultats possibles qui pourraient être affichés sont discutés dans les sections « Protocole : évaluation des échantillons d'ADN », « Protocol: Detection of KRAS mutations » et « Troubleshooting guide » de ce mode d'emploi.

Une tumeur contient rarement plus d'une mutation. Dans ces cas, la mutation produisant la valeur de ΔC_T la plus faible sera identifiée.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour toute assistance technique ou pour obtenir des renseignements supplémentaires, consultez notre centre d'assistance technique à l'adresse **www.qiagen.com/Support** (les coordonnées sont disponibles sur le site **www.qiagen.com**).

Commentaires et suggestions

Résultats non valides

- | | |
|--|---|
| a) Les conditions de conservation pour un ou plusieurs composants n'étaient pas conformes aux consignes indiquées à la section « Conservation et manipulation des réactifs », page 18. | Vérifiez les conditions de conservation et la date d'expiration (consultez l'étiquette) des réactifs et utilisez une nouvelle trousse, si nécessaire. |
| b) La trousse <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit est périmée. | Vérifiez les conditions de conservation et la date d'expiration (consultez l'étiquette de la trousse) des réactifs et utilisez une nouvelle trousse <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit, si nécessaire. |

Les échantillons du TSM produisent un résultat positif dans le canal FAM

- | | |
|---|--|
| Une contamination s'est produite pendant la préparation de la PCR | Répétez la PCR avec de nouveaux réactifs en réplicats.
Si possible, fermez les tubes de PCR immédiatement après l'ajout de l'échantillon testé.
Vérifiez que l'espace de travail et les instruments sont décontaminés à intervalles réguliers. |
|---|--|

Indicateurs du progiciel *therascreen* KRAS Assay Package

Le Tableau 9 présente une liste de tous les indicateurs possibles qui pourraient être générés par le progiciel *therascreen* KRAS Assay Package, ainsi que leur définition et les actions à entreprendre.

Tableau 9. Indicateurs du progiciel *therascreen* KRAS Assay Package

Indicateur	Définition	Mesure à prendre
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Série d'analyses de PCR non valide – La valeur de C_T du canal FAM est en dehors de la plage prédéfinie de valeurs acceptables pour le témoin positif dans la réaction témoin.	Répétez la série d'analyses de PCR en entier.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Série d'analyses de PCR non valide – La valeur de C_T du canal FAM est en dehors de la plage prédéfinie de valeurs acceptables pour une ou plusieurs réactions de mutation.	Répétez la série d'analyses de PCR en entier.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Série d'analyses de PCR non valide – Il est impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le témoin positif (mélange réactionnel des témoins).	Répétez la série d'analyses de PCR en entier.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Série d'analyses de PCR non valide – Il est impossible d'interpréter les données de fluorescence du témoin positif (mélange réactionnel des mutations).	Répétez la série d'analyses de PCR en entier.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Série d'analyses de PCR non valide – La valeur obtenue pour le témoin interne est supérieure à la plage prédéfinie de valeurs acceptables pour le témoin négatif.	Répétez la série d'analyses de PCR en entier.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Série d'analyses de PCR non valide – La valeur obtenue pour le témoin interne est inférieure à la plage prédéfinie de valeurs acceptables pour le témoin négatif.	Répétez la série d'analyses de PCR en entier.
NTC_INVALID_CT	Série d'analyses de PCR non valide – La valeur obtenue dans le canal FAM est non valide (inférieure à la limite) pour le témoin négatif.	Répétez la série d'analyses de PCR en entier.
NTC_INVALID_DATA	Série d'analyses de PCR non valide – Il est impossible d'interpréter les données de fluorescence du témoin négatif.	Répétez la série d'analyses de PCR en entier.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Échantillon non valide – Il est impossible d'interpréter les données de fluorescence de la réaction témoin de l'échantillon.	Préparez une nouvelle série d'analyses de PCR pour tester à nouveau le ou les échantillons correspondants.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Échantillon non valide – La valeur de C_T du canal FAM est trop basse dans la réaction témoin de l'échantillon.	Diluez l'échantillon pour augmenter la valeur de C_T de la réaction témoin. Cette dilution doit être calculée en supposant qu'une dilution dans un rapport de 1:1 avec l'eau fournie dans la trousse augmentera la valeur de C_T de 1,0. Une fois l'échantillon dilué, préparez une nouvelle série d'analyses de PCR pour tester à nouveau l'échantillon.

Suite du tableau à la page suivante.

Tableau 9. Indicateurs du progiciel theascreen KRAS Assay Package (suite)

Indicateur	Définition	Mesure à prendre
SAMPLE_CTRL_FAIL	Échantillon non valide – La valeur de C_T du canal FAM est trop élevée dans la réaction témoin de l'échantillon.	Préparez une nouvelle série d'analyses de PCR pour tester à nouveau les échantillons. Si la nouvelle série d'analyses de PCR produit un résultat non valide, procédez à une nouvelle extraction à partir de coupes FFPE fraîches (≥ 4 coupes). Préparez une nouvelle série d'analyses de PCR pour tester le nouvel extrait. Si le résultat est non valide, répétez cette deuxième extraction. Si l'échantillon ne produit pas un résultat valide après cette série d'analyses de PCR, l'échantillon est classé comme ayant un état mutationnel indéterminé et aucune autre analyse ne doit être effectuée.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Valeur de C_T trop élevée (ou aucune valeur de C_T) pour le témoin interne (HEX), échantillon mutant-négatif (FAM).	Si l'état de l'échantillon est classé valide — Aucune action. Si l'état de l'échantillon est classé non valide, préparez une nouvelle série d'analyses de PCR pour tester à nouveau l'échantillon. Si la nouvelle série d'analyses de PCR produit un résultat non valide, procédez à une nouvelle extraction à partir de coupes FFPE fraîches. Préparez une nouvelle série d'analyses de PCR pour tester le nouvel extrait. Si le résultat est non valide, répétez cette deuxième extraction. Si l'échantillon ne produit pas un résultat valide après cette série d'analyses de PCR, l'échantillon est classé comme ayant un état mutationnel indéterminé et aucune autre analyse ne doit être effectuée.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Résultat d'un tube réaction de mutation non valide — Valeur de C_T trop basse pour le témoin interne (HEX) de l'échantillon	Si l'état de l'échantillon est classé valide — Aucune action. Si l'état de l'échantillon est classé non valide, préparez une nouvelle série d'analyses de PCR pour tester à nouveau l'échantillon. Si la nouvelle série d'analyses de PCR produit un résultat non valide, procédez à une nouvelle extraction à partir de coupes FFPE fraîches. Préparez une nouvelle série d'analyses de PCR pour tester le nouvel extrait. Si le résultat est non valide, répétez cette deuxième extraction. Si l'échantillon ne produit pas un résultat valide après cette série d'analyses de PCR, l'échantillon est classé comme ayant un état mutationnel indéterminé et aucune autre analyse ne doit être effectuée.

Suite du tableau à la page suivante.

Tableau 9. Indicateurs du progiciel theascreen KRAS Assay Package (suite)

Indicateur	Définition	Mesure à prendre
SAMPLE_INVALID _DATA	Résultat d'un tube réaction de mutation non valide – Il est impossible d'interpréter les données de fluorescence du témoin interne.	<p>Si l'état de l'échantillon est classé valide – Aucune action.</p> <p>Si l'état de l'échantillon est classé non valide, préparez une nouvelle série d'analyses de PCR pour tester à nouveau l'échantillon. Si la nouvelle série d'analyses de PCR produit un résultat non valide, procédez à une nouvelle extraction à partir de coupes FFPE fraîches. Préparez une nouvelle série d'analyses de PCR pour tester le nouvel extrait. Si le résultat est non valide, répétez cette deuxième extraction. Si l'échantillon ne produit pas un résultat valide après cette série d'analyses de PCR, l'échantillon est classé comme ayant un état mutationnel indéterminé et aucune autre analyse ne doit être effectuée.</p>
MUTATION_EARLY_CT	Résultat du tube de réaction de mutation non valide – Valeur de C _T du canal FAM trop basse pour l'échantillon	<p>Si l'état de l'échantillon est classé valide – Aucune action.</p> <p>Si l'état de l'échantillon est classé non valide, préparez une nouvelle série d'analyses de PCR pour tester à nouveau l'échantillon. Si la nouvelle série d'analyses de PCR produit un résultat non valide, procédez à une nouvelle extraction à partir de coupes FFPE fraîches. Préparez une nouvelle série d'analyses de PCR pour tester le nouvel extrait. Si le résultat est non valide, répétez cette deuxième extraction. Si l'échantillon ne produit pas un résultat valide après cette série d'analyses de PCR, l'échantillon est classé comme ayant un état mutationnel indéterminé et aucune autre analyse ne doit être effectuée.</p>
SAMPLE_POSITIVE _AND_INVALID	Une ou plusieurs mutations sont valides et positives dans un échantillon, mais une ou plusieurs mutations ne sont pas valides dans le même échantillon (un avertissement, mais pas une erreur).	Aucune action.

Contrôle de la qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

Limitations

Le test est conçu pour détecter 7 mutations dans les codons 12 et 13 du gène KRAS. Les échantillons dont les résultats indiquent « No Mutation Detected » (Aucune mutation détectée) pourraient contenir des mutations du gène KRAS qui ne sont pas détectées par le dosage (p. ex, 13CYS).

La détection des mutations dépend de l'intégrité des échantillons et de la quantité d'ADN amplifiable dans l'échantillon. La procédure doit être répétée lorsque l'évaluation initiale de l'ADN dans l'échantillon indique que la quantité est insuffisante ou trop élevée pour l'analyse des mutations.

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est utilisée dans le cadre d'une procédure d'amplification en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR). Comme pour toute procédure de PCR, les échantillons pourraient être contaminés par des sources externes d'ADN dans l'environnement de test et par l'ADN du témoin positif. Il convient de faire preuve de prudence afin d'éviter toute contamination des échantillons et des mélange réactionnels.

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ne doit pas être utilisée pour le diagnostic d'une maladie.

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est conçue uniquement pour différencier les échantillons de type sauvage et les échantillons mutant-positifs. Le test a été conçu pour que chaque réaction de mutation possède une sensibilité très élevée et spécifique pour la mutation testée. Cependant, une réactivité croisée peut se produire entre les tubes de réaction de mutation où une mutation est détectée et d'autres tubes de réaction de mutation. Si plus d'une réaction de mutation est positive, le résultat retenu correspond à la valeur de ΔCT la plus basse.

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est validée uniquement pour les tissus de CCR et de CPNPC fixés dans le formaldéhyde et enrobés dans la paraffine.

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a été validée uniquement pour une utilisation avec de l'ADN extrait à l'aide de la trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Seul l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM a été validé pour une utilisation avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Les résultats attendus

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit procure une indication qualitative de la présence de 7 mutations dans les codons 12 et 13 de l'oncogène KRAS. Le résultat de chaque dosage est affiché comme étant « Mutation Positive » (Mutant-positif), « No Mutation Detected » (Aucune mutation détectée), « Invalid » (non valide) pour chaque mutation ou, si une réaction témoin de la série d'analyses échoue, « Run Control Failed » (Échec d'un témoin de la série d'analyses). Dans le cas d'un résultat « Mutation Positive » (Mutant-positif), la mutation spécifique du gène KRAS détectée est également affichée.

Les caractéristiques des performances pour les échantillons de CCR

Les performances analytiques

Les caractéristiques spécifiques des performances de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ont été déterminées par des études menées sur des échantillons de tissus fixés au formaldéhyde et enrobés dans la paraffine (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) prélevés sur des patients atteints d'un CCR et sur 8 lignées cellulaires humaines fixées dans le formaldéhyde et enrobées dans la paraffine (lignées cellulaires FFPE), dont 7 lignées contiennent des mutations connues du gène KRAS qui sont détectées par le dosage et 1 lignée expriment le gène KRAS de type sauvage (c.-à-d., aucune mutation dans les codons 12 et 13). L'état mutationnel des échantillons a été confirmé par le séquençage bidirectionnel de Sanger.

Valeur de séparation

Au total, 220 échantillons FFPE ont été analysés à l'aide d'une méthode conforme aux recommandations de l'EP17-A du Comité national pour les normes de laboratoire clinique (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) de 2004, afin d'établir les valeurs de séparation pour le dosage. La plage de C_T de la réaction témoin comprend des valeurs comprises entre 21,92 et 32,00. Les valeurs de séparation, basées sur la valeur de C_T de la réaction témoin soustraites de la valeur de C_T des réactions de mutation (ΔC_T), sont présentées au Tableau 10.

Tableau 10. Valeurs de séparation établies pour chaque dosage de mutation

	Dosage de mutation (ΔC_T)					
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	13ASP
Valeur de séparation (ΔC_T) ≤	8,0	6,6	8,0	8,0	8,0	7,5

Limite du blanc

Des échantillons ont été analysés sans matrice pour évaluer les performances de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit en l'absence de matrice mutant-positif et pour s'assurer qu'un échantillon blanc ne produit pas un signal analytique pouvant indiquer une faible concentration de mutation. Les résultats n'ont démontré aucune valeur de C_T détectable pour les tubes de réaction témoin ou de réaction de mutation (toutes les valeurs de C_T du témoin interne étaient valides).

Comparaison avec la méthode de référence analytique

Deux études ont été menées pour démontrer la concordance dans l'état mutationnel des échantillons de CCR testés avec la trousse de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit et par séquençage bidirectionnel. Dans la première étude, 350 échantillons de tumeurs de patients atteints d'un CCR ont été sélectionnés en fonction d'un ensemble de caractéristiques cliniques, démographiques et d'échantillons tumoraux initiales. À l'aide d'une technique statistique d'échantillonnage aléatoire, 150 échantillons dont l'état mutationnel était inconnu ont été choisis pour cette évaluation. Ces 150 échantillons FFPE ont été évalués, puis testés pendant cette étude à l'aide de mesures statistiques de concordance/discordance tirées des recommandations de l'EP12-A2 du CLSI (2008). Au total, 137 des échantillons FFPE ont produit des résultats valides à la fois avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit et le séquençage bidirectionnel. Les résultats ont démontré que la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a identifié 2 échantillons mutant-négatifs, mais le séquençage bidirectionnel a indiqué que l'un d'eux était positif pour la mutation 12ASP et l'autre était positif pour la mutation 13ASP. D'autre part, 3 échantillons ont été signalés mutant-positifs pour le gène KRAS par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, alors qu'ils étaient tous mutant-négatifs selon le séquençage bidirectionnel. De plus, 1 échantillon porteur de la mutation 12ARG selon la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit possédait la mutation 12ASP selon le séquençage bidirectionnel. Les 5 échantillons classés mutant-négatifs par le séquençage bidirectionnel étaient indéterminés (3 échantillons) ou non valides (2 échantillons) selon la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (données non présentées). Un échantillon classé indéterminé par le séquençage bidirectionnel de Sanger possédait la mutation 12SER selon la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (données non présentées).

Le Tableau 11 présente l'analyse de concordance entre la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit et le séquençage bidirectionnel.

Tableau 11. Comparaison de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit et du séquençage bidirectionnel de Sanger

Appel de mutation par la trousse du KRAS	Appel de mutation par le séquençage bidirectionnel								Total
	Nég	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	
Négatif	80	–	–	1	–	–	–	1	82
Positif 12ALA	–	3	–	–	–	–	–	–	3
Positif 12ARG	–	–	–	1	–	–	–	–	1
Positif 12ASP	–	–	–	20	–	–	–	–	20
Positif 12CYS	–	–	–	–	3	–	–	–	3
Positif 12SER	–	–	–	–	–	–	–	–	0
Positif 12VAL	–2	–	–	–	–	–	14	–	16
Positif 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	11	12
Total	83	3	0	22	3	0	14	12	137

Les résultats indiquent un pourcentage de concordance positive (PCP) de 96,3 %, un pourcentage de concordance négative (PCN) de 96,3 % et un pourcentage de concordance globale (PCG) de 96,4 %. Les résultats globaux, à l'exception de 6 échantillons ayant échoué le séquençage bidirectionnel de Sanger, sont présentés dans le Tableau 12 ci-dessous.

Tableau 12. Analyse de concordance

Mesure de la concordance	Fréquence (%)	Intervalle de confiance (IC) à 95 %
Pourcentage de concordance globale	132/137 (96,35)	92,69–98,21
Pourcentage de concordance positive	52/54 (96,30)	89,41–98,77
Pourcentage de concordance négative	80/83 (96,39)	91,30–98,55

Un deuxième ensemble d'échantillons a été évalué pour compléter les données de la première étude. Cet ensemble de 271 échantillons de CCCR FFPE comprenait 250 échantillons dont l'état mutationnel était inconnu et 21 échantillons dont l'état mutationnel était connu, pour augmenter le nombre de mutations rares. Ils ont été analysés par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit et le séquençage bidirectionnel de Sanger, tel que décrit ci-dessus à des fins de comparaison. Au total, 13 (~5 %) échantillons ont nécessité une macrodissection pour leur analyse avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Sur les 271 échantillons ayant obtenu des résultats par le séquençage bidirectionnel, 24 échantillons ont été classés comme étant indéterminés par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (valeur de C_T de la réaction témoin en dehors de la plage acceptable; données non présentées). L'analyse de concordance a été effectuée sur 247 échantillons ayant produit des résultats valides à la fois avec le séquençage bidirectionnel et la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Il y avait 9 échantillons discordants. L'un des 247 échantillons était mutant-positif selon le séquençage bidirectionnel, alors que la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a fourni un résultat « No Mutation Detected » (Aucune mutation détectée). Les 8 autres échantillons étaient mutant-positifs selon la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, mais mutant-négatifs selon le séquençage bidirectionnel. Dans l'ensemble, le pourcentage de concordance était de 96,4 %. Les données confirment la performance de précision de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (voir Tableau 13 et Tableau 14).

Tableau 13. Analyse de concordance (deuxième étude)

Mesure de la concordance	Fréquence (%)	Intervalle de confiance (IC) à 95 %
Pourcentage de concordance globale	238/247 (96,36)	93,73–98,09
Pourcentage de concordance positive	106/107 (99,07)	95,64–99,95
Pourcentage de concordance négative	132/140 (94,29)	89,93–97,13

Tableau 14. Comparaison de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit et du séquençage bidirectionnel de Sanger (deuxième étude)

Appel de mutation par la trousse du KRAS	Appel de mutation par le séquençage bidirectionnel								Total
	Nég	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	
Négatif	132	–	–	–	–	1	–	1	133
Positif 12ALA	–	10	–	–	–	–	–	–	10
Positif 12ARG	5	–	5	–	–	–	–	–	10
Positif 12ASP	–	–	–	31	–	–	–	–	31
Positif 12CYS	1	–	–	–	11	–	–	–	12
Positif 12SER	–	–	–	–	–	13	–	–	13
Positif 12VAL	2	–	–	–	–	–	25	–	27
Positif 13ASP	–	–	–	–	–	–	–	11	11
Total	140	10	5	31	11	14	25	11	247

Limite de détection (LD)

La plage de travail de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est basée sur la quantité d'ADN amplifiable dans l'échantillon déterminée par la valeur de C_T de la réaction témoin. La plage de concentrations initiales d'ADN indiquée pour le dosage est définie par la plage prédéterminée de valeurs de C_T de 21,92 à 32,00 pour la réaction témoin. La LD correspond au pourcentage minimum d'ADN mutant qui peut être détecté dans le bruit de fond de l'ADN de type sauvage, lorsque la concentration totale d'ADN amplifiable se situe dans la plage de concentrations initiales d'ADN et sous la valeur de ΔC_T de séparation. Une étude a été menée pour déterminer la LD de chacune des 7 réactions de mutation spécifique fournies dans la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Pour la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, la LD de l'ADN mutant dans le bruit de fond de l'ADN de type sauvage correspond au plus faible pourcentage de dilution pour lequel 95 % des réplicats de test de chaque échantillon mutant-positif sont confirmés positifs.

Huit lignées cellulaires FFPE (7 lignées dont le pourcentage de mutations dans l'ADN était connu et 1 lignée de type sauvage) ont été utilisées pour cette évaluation. Le pourcentage de mutation dans la quantité totale d'ADN amplifiable (pourcentage d'ADN mutant) avait été déterminée précédemment par la méthode de séquençage bidirectionnelle de Sanger à partir de cellules non fixées, suivie d'une analyse des pics relatifs. Dans 3 lignées cellulaires, le pourcentage d'ADN mutant était de 100 % (c.-à-d., l'ADN de la lignée cellulaire contenait une mutation homozygote). Les autres lignées cellulaires présentaient une zygosité mixte. Plusieurs extraits d'ADN de chaque échantillon ont été regroupés pour produire des stocks d'ADN. Ensuite, les stocks d'ADN ont été normalisés pour obtenir les valeurs cibles de C_T pour la réaction témoin. Les extraits d'ADN mutant normalisés ont été dilués avec l'extrait d'ADN de type sauvage normalisé pour préparer une série de dilutions de chaque extrait contenant la même quantité totale d'ADN amplifiable avec des quantités variables d'ADN mutant. Ensuite, des dilutions en série ont été préparées à partir de ces échantillons et analysées en plusieurs réplicats. La première série de dilutions a été préparée pour obtenir la valeur de C_T médiane de la réaction témoin (environ 26). Neuf réplicats par dilution ont été testés. Le pourcentage d'appels corrects en fonction du pourcentage de dilution de la mutation est indiqué dans le Tableau 15. Les cases surlignées indiquent le pourcentage pour lequel plus de 95 % des réplicats ont produit des appels corrects.

Tableau 15. Pourcentage d'appels corrects

% de dilution de la mutation	% d'appels corrects						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
0,78	100	0	33,3	55,6	22,2	66,7	0
1,56	100	33,3	100	100	88,9	100	0
3,13	100	77,8	100	100	100	100	66,7
6,25	100	100	100	100	100	100	100
12,5	100	100	100	100	100	100	100
25,0	100	100	100	100	100	100	100
50,0	100*	100	100	100	100	100	100

* Le pourcentage de dilution de la mutation pour cet échantillon était de 40,0 %.

Les résultats de la première série de dilutions ont été utilisés pour préparer d'autres dilutions afin de confirmer les LD en utilisant des plages de pourcentages de dilution des mutations spécifiques aux réactions qui sont plus étroites, avec des niveaux faibles et élevés dans la plage de concentrations initiales d'ADN. Douze réplicats ont été évalués pour la série de dilutions élevées. Le pourcentage d'appels corrects en fonction du pourcentage de dilution, pour la série de dilutions élevées (valeurs de C_T cibles approximatives de 23 à 24), est présenté au Tableau 16. Les cases surlignées indiquent le pourcentage pour lequel plus de 95 % des réplicats ont produit des appels corrects.

Tableau 16. % d'appels corrects (dilutions élevées)

% de dilution de la mutation (dilutions élevées)						
12ALA	0,13	0,27	0,54	1,08	2,15	4,30
% d'appels corrects	0	0	91,7	100	100	100
12ASP	0,56	1,13	2,25	4,50	9,00	18,00*
% d'appels corrects	0	8,3	33,3	83,3	100	100
12ARG	0,16	0,33	0,65	1,30	2,60	5,20
% d'appels corrects	0	0	8,3	100	100	100
12CYS	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,90
% d'appels corrects	0	0	8,3	83,3	100	100
12SER	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	10,00
% d'appels corrects	0	0	33,3	66,7	100	100
12VAL	0,17	0,34	0,69	1,38	2,75	5,50
% d'appels corrects	0	0	16,7	100	100	100
13ASP	0,63	1,25	2,50	5,0	10,0	20,0
% d'appels corrects	0	0	0	100	100	100

* Onze réplicats valides.

Vingt-quatre réplicats de chaque dilution ont été utilisés pour la série de dilutions faibles, sauf indication contraire. Le pourcentage d'appels corrects en fonction du pourcentage de dilution pour la série de dilutions faibles (valeurs de C_T cibles approximatives de 31) est présenté au Tableau 17.

Tableau 17. % d'appels corrects (dilutions faibles)

% de dilution de la mutation (dilutions faibles)							
12ALA	0,27	0,54	1,08	2,15	4,30	8,60	12,90
% d'appels corrects	12,5	20,8	33,3	83,3	100	100	100
12ASP	0,56	1,13	2,25	4,50	9,0	18,0	27,0
% d'appels corrects	0	16,7	29,2	58,3	100	100	100
12ARG*	0,33	0,65	1,30	2,60	5,20	10,4	15,6
% d'appels corrects	8,3	4,2	29,2	52,2	95,8	100	100
12CYS	0,24	0,49	0,98	1,95	3,90	7,80	11,7
% d'appels corrects	8,3	4,2	20,9	54,2	83,3	100	100
12SER	0,63	1,25	2,50	5,0	10,0	20,0	30,0
% d'appels corrects	0	0	8,3	33,3	70,9	83,3	100
12VAL†	0,34	0,69	1,38	2,75	5,50	11,00	16,50
% d'appels corrects	4,3	16,7	46,7	75,0	100	100	100
13ASP	0,63	1,25	2,5	5,0	10,0	20,0	30,0
% d'appels corrects	0	4,2	8,3	33,3	70,8	100	100

* Avec une dilution de 2,60, le nombre de réplicats valides était de 23.

† Pour la mutation 12VAL, les nombres de réplicats valides dans la série était de 23, 24, 15, 16, 13, 12 et 19.

Des modèles de régression logistique ont été appliqués individuellement à chaque dosage pour les ensembles de données obtenues avec des concentrations initiales d'ADN faibles et élevées. Dans ces modèles, la variable de la réponse était le résultat binaire de mutation détectée (détecte = 1) et de mutation non détectée (détecte = 0), et la variable explicative continue était la dilution de la mutation de log₂ %. Les LD ont été exprimées en pourcentage de dilution de la mutation, ce qui a produit une probabilité de détection prédite de 0,95. Les LD déterminées à partir des séries de dilution, en commençant avec les valeurs de C_T faibles ou élevées, sont présentées dans le Tableau 18.

Tableau 18. Les données de régression logistique pour les valeurs de C_T faibles et élevées des séries de dilution

Dosage	Faibles	Élevées
12ALA	4,25	0,56
12ASP	10,23	6,43
12ARG	7,27	0,87
12CYS	6,90	1,21
12SER	25,75	4,20
12VAL	5,17	0,90
13ASP	18,83	4,16

Les valeurs finales des LD obtenues avec les lignées cellulaires FFPE, lorsque la valeur de C_T initiale est comprise entre environ 22 et 27, sont présentées dans le Tableau 19. À l'extrémité inférieure de la plage des valeurs de C_T initiales, la sensibilité du dosage diminue, car la concentration initiale d'ADN pourrait ne pas contenir suffisamment de copies pour soutenir les mêmes rapports d'ADN de type sauvage/ADN mutant en pourcentage que ceux observés au milieu ou à l'extrémité supérieure de la plage de travail.

Tableau 19. Valeurs de LD pour chaque dosage de mutation avec des lignées cellulaires FFPE

Dosage	LD C_{95} (pourcentage d'ADN mutant dans l'ADN de type sauvage)
12ALA	0,8
12ASP	6,4
12ARG	2,6
12CYS	1,5
12SER	5,6
12VAL	1,6
13ASP	6,4

Effet de la concentration initiale d'ADN

Lorsque des échantillons ayant des concentrations variables d'ADN total contiennent le même pourcentage d'ADN mutant, les valeurs de ΔC_T mesurées devraient être comparables. L'objectif de l'étude était de démontrer que les performances de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sont cohérentes pour l'ensemble de la plage de concentrations initiales d'ADN total (C_T témoin) dans le dosage. L'ADN extrait de 8 lignées cellulaires FFPE a été utilisé pour préparer des stocks d'ADN présentant la plus faible valeur de C_T possible pour la réaction témoin. Ensuite, les stocks d'ADN concentrés ont été dilués pour préparer différentes concentrations d'ADN couvrant l'ensemble de la plage de travail (un total de 5 dilutions, y compris le stock initial concentré). Pour chaque point de la plage de travail, suffisamment de matériel a été préparé pour effectuer 6 réplicats de test. La plage de dilution pour chaque réaction de mutation, et la valeur de ΔC_T moyenne obtenue à partir des résultats, sont présentées dans le Tableau 20. Pour chacune des mutations détectées par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, les valeurs de ΔC_T mesurées pour les différentes concentrations initiales d'ADN total couvrant l'ensemble de la plage de travail du dosage a respecté les critères d'acceptation prédéfinis de l'étude. Dans l'ensemble, malgré une légère augmentation de la valeur de ΔC_T avec l'augmentation de la concentration initiale d'ADN total, les valeurs de ΔC_T étaient cohérentes pour l'ensemble de la plage de travail de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, selon les critères d'acceptation prédéterminés.

Tableau 20. Effet de la concentration initiale d'ADN sur les valeurs de ΔC_T pour l'ensemble de la plage de valeurs de C_T de la réaction témoin — lignées cellulaires FFPE

Mutation	Nombre de réplicats				
	Dilution 1 C_T ~20–21	Dilution 2 C_T ~23–24	Dilution 3 C_T ~26–27	Dilution 4 C_T ~29–30	Dilution 5 C_T ~32–33
	Valeur de ΔC_T	Valeur de ΔC_T	Valeur de ΔC_T	Valeur de ΔC_T	Valeur de ΔC_T
12ALA	1,56	1,25	1,16	1,14	1,27
12ASP*	2,46	2,18	2,11	2,11	1,75
12ARG	1,18	0,63	1,08	0,94	1,06
12VAL	0,29	0,25	0,15	0,26	-0,1
DNA	Valeur de C_T ~22–23	Valeur de C_T ~24–25	Valeur de C_T ~27–28	Valeur de C_T ~29–30	Valeur de C_T ~32–33
12SER	2,91	2,21	2,15	2,15	2,08
12CYS	0,98	0,71	0,58	0,81	0,67
13ASP	3,57	2,84	2,54	2,46	2,62

* Le nombre total de réplicats pour la mutation 12ASP était de 27.

Linéarité/efficacité de l'amplification en fonction de la concentration initiale d'ADN

La linéarité et l'efficacité de l'amplification de la PCR pour chaque réaction de mutation, par rapport à la réaction témoin et pour l'ensemble de la plage de travail de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ont été démontrées. L'efficacité de l'amplification a été calculée pour chacune des réactions de mutation et la réaction témoin en utilisant l'équation : $[2^{(-1/\text{pente})}]$

- 1. L'efficacité de l'amplification de la réaction témoin, par rapport à la réaction de mutation, indique que les valeurs de ΔC_T et donc, l'appel de mutation, sont cohérentes pour l'ensemble de la plage de travail du dosage. La plus grande différence entre les efficacités d'amplification de la réaction témoin et d'une réaction de mutation a été observée pour le dosage de la mutation 13ASP, avec une différence d'efficacité moyenne d'environ 14,5 %. Un résumé des données est présenté dans le Tableau 21.

Tableau 21. Efficacités d'amplification

Échan- tillon		Intersection	Erreur type de l'inter- section	Pente calculée	Erreur type (pente)	Limite inférieure de l'inter- valle de confiance bilatéral à 95 % (pente)	Limite supérieure de l'inter- valle de confiance bilatéral à 95 % (pente)	Efficacité d'amplification	Différence entre les efficacités d'amplifications
12ALA	C _T témoin	21,060	0,060	-1,008	0,007	-1,023	-0,993	0,989	0,03
	C _T 12ALA	22,476	0,103	-0,987	0,013	-1,013	-0,961	1,019	
12ARG	C _T témoin	20,825	0,083	-1,035	0,01	-1,056	-1,014	0,954	0,056
	C _T 12ARG	23,237	0,083	-0,993	0,011	-1,016	-0,97	1,01	
12ASP	C _T témoin	20,385	0,13	-1,013	0,16	-1,046	-0,98	0,982	-0,003
	C _T 12ASP	21,347	0,065	-1,015	0,008	-1,032	-0,999	0,979	
12CYS	C _T témoin	23,437	0,063	-0,981	0,01	-1,003	-0,96	1,026	0,032
	C _T 12CYS	24,289	0,039	-0,961	0,006	-0,974	-0,947	1,058	
12SER	C _T témoin	22,568	0,050	-1,003	0,008	-1,02	-0,986	0,996	0,105
	C _T 12SER	25,212	0,087	-0,934	0,014	-0,963	-0,904	1,101	
12VAL	C _T témoin	21,208	0,047	-0,995	0,006	-1,007	-0,983	1,007	0,033
	C _T 12VAL	21,532	0,043	-0,972	0,005	-0,983	-0,961	1,04	
13ASP	C _T témoin	23,207	0,056	-1,001	0,009	-1,02	-0,982	0,999	0,145
	C _T 12ASP	26,466	0,106	-0,909	0,017	-0,945	-0,873	1,144	

Linéarité/efficacité de l'amplification en fonction du pourcentage de mutation

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet d'un échantillon mutant-positif dilué en série sur l'efficacité de l'amplification, pour l'ensemble la plage de travail de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, en commençant par les valeurs de C_T initiales d'environ 22 à 23. Les extraits d'ADN des lignées cellulaires FFPE ont été initialement évalués par des lectures de densité optique avant d'effectuer la PCR avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Ensuite, les stocks d'ADN ont été préparés de manière à obtenir une valeur de C_T d'environ 23 pour la réaction témoin. Les stocks ont été dilués en série d'un facteur de deux à chaque étape en utilisant de l'ADN de type sauvage, afin de maintenir constante la quantité totale d'ADN de type sauvage en faisant varier le pourcentage d'ADN mutant dans la matrice. Ainsi, chacune des matrices générées contenait la même quantité absolue et concentration d'ADN, mais avec des rapports différents d'ADN de type sauvage et d'ADN mutant. Des stocks d'ADN suffisants pour 6 réplicats par mutation ont été préparés. Les valeurs de C_T et ΔC_T ont été calculées pour chaque mutation et chaque point de dilution. Les valeurs de C_T de la réaction de mutation ont été tracées et les taux d'efficacité ont été calculés. Les valeurs de C_T de la réaction témoin étaient cohérentes pour l'ensemble de la série de dilutions de chaque mutation. Les valeurs de ΔC_T ont été calculées pour chaque échantillon dont la valeur de C_T de la réaction témoin se situait dans la plage prédéterminée (21,92 à 32,00). Un modèle de régression linéaire a été appliqué aux valeurs de C_T de la réaction de mutation pour une dilution de la concentration initiale d'ADN de \log_2 . La pente et les intervalles de confiance à 95 % ont été rapportés. Cette étude de linéarité a démontré que la dilution des mutations dans le bruit de fond d'une concentration constante d'ADN de type sauvage n'entraînait pas des variations significatives dans les efficacités d'amplification en dehors des valeurs déterminées. Les efficacités d'amplification différaient de moins de $\pm 10\%$ (Tableau 22).

Tableau 22. Efficacités d'amplification

Échantillon	Intersection	Erreur type de l'intersection	Pente calculée	Erreur type (pente)	Limite inférieure de l'intervalle de confiance bilatéral à 95 % (pente)	Limite supérieure de l'intervalle de confiance bilatéral à 95 % (pente)	Efficacité d'amplification
12ALA	23,540	0,025	-0,968	0,010	-0,989	-0,947	1,047
12ASP	24,804	0,054	-1,030	0,022	-1,075	-0,985	0,960
12ARG	24,226	0,028	-1,008	0,011	-1,031	-0,984	0,990
12CYS	24,354	0,027	-0,981	0,011	-1,003	-0,959	1,027
12SER	25,376	0,054	-0,892	0,022	-0,937	-0,847	1,174
12VAL	22,703	0,035	-1,021	0,014	-1,050	-0,992	0,972
13ASP	27,555	0,057	-0,810	0,023	-0,857	-0,763	1,353

Substances interférentes

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet des substances potentiellement interférentes sur les performances de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. L'étude a analysé l'effet de chaque substance sur les valeurs de ΔC_T et l'état mutationnel des échantillons du test en effectuant des expériences d'enrichissement avec deux concentrations. Les concentrations sont présentées au Tableau 23.

Tableau 23. Quantités de substances interférentes utilisées dans chaque dosage (c.-à-d., 1x)

Substance interférente	Quantité actuelle élevée (µl/200 µl d'éluat)	Quantité actuelle faible (µl/200 µl d'éluat)
Paraffine (dans le xylène)	2,00 x 10 ⁻⁴	5,00 x 10 ⁻⁵
Xylène	2,00 x 10 ⁻⁴	5,00 x 10 ⁻⁵
Éthanol	1,35 x 10 ⁻³	3,38 x 10 ⁻⁴
Buffer ATL	5,40 x 10 ⁻⁴	1,35 x 10 ⁻⁴
Protéinase K	1,32 x 10 ⁻⁵	3,30 x 10 ⁻⁶
Buffer AL	1,33 x 10 ⁻³	3,33 x 10 ⁻⁵
Tampon de lavage (AW1)	0,50	1,25 x 10 ⁻¹
Tampon de lavage (AW2)	5,00	1,25

Aucune des substances potentiellement interférentes, évaluées à des concentrations utilisées dans le cadre d'une utilisation normale, n'a affecté la capacité de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit de différencier les échantillons mutant-positifs et les échantillons mutant-négatifs.

En plus de l'étude sur les substances interférentes, l'effet potentiel de la nécrose dans les échantillons cliniques a été évalué pour déterminer si des quantités élevées de tissu nécrotique dans les échantillons tumoraux ont un effet sur la capacité d'obtenir des données valides. Sur les 421 échantillons évalués dans les études de comparaison avec la méthode de référence analytique (Comparison to Analytical Reference Method), 29 échantillons étaient nécrotiques à plus de 50 %, tel que déterminé par un examen de pathologie. Sur ces 29 échantillons, 28 ont produit des résultats valides concordants avec ceux du séquençage bidirectionnel de Sanger. Un seul résultat n'était pas valide en raison d'une quantité d'ADN insuffisante.

Contamination croisée

L'objectif de cette étude était de déterminer l'étendue de la contamination croisée entre les échantillons d'ADN pouvant produire des résultats faux positifs, à l'aide de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Les sources potentielles de contamination croisée sont les suivantes :

- L'extraction des échantillons (p. ex. le grattage des lames)
- Le pipetage des échantillons
- La fermeture des tubes d'échantillon avec les bouchons
- La contamination des réactifs de la trousse pendant leur utilisation
- Le chargement des tubes de dosage sur l'instrument Rotor-Gene Q

Pour cette étude, des échantillons d'étalonnage FFPE ont été utilisés : l'étalon de type sauvage et l'étalon de la mutation 12ALA (car la réaction de mutation du 12ALA possède la plus faible LD de la trousse).

L'étude comprenait 10 série d'analyses de PCR conçues pour déterminer le potentiel de contamination dans et entre les série d'analyses sur l'instrument Rotor-Gene Q. Dans ces séries d'analyses, des tubes contenant de l'ADN de type sauvage ont été utilisés pour détecter toute contamination par l'ADN mutant.

Les résultats de cette étude n'ont révélé aucune contamination détectable dans les extraits d'ADN de type sauvage utilisés pour détecter la contamination croisée.

Exclusivité/réactivité croisée

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit contient 8 réactions différentes (une seule réaction témoin qui détecte une région non polymorphe du gène KRAS et 7 réactions qui détectent des mutations spécifiques). Aucune réaction ne détecte spécifiquement la séquence sauvage du gène KRAS au codon 12 ou 13. Le résultat « No Mutation Detected » (Aucune mutation détectée) (c.-à-d., de type sauvage) du KRAS est déterminé par l'absence de l'une des 7 mutations entraînant un résultat mutant-positif. Par conséquent, il est nécessaire de démontrer la quantité d'amplification non spécifique ou de réactivité croisée qui se produit dans chaque réaction en présence de quantités excessives d'ADN du gène KRAS de type sauvage, afin de prévenir les résultats faux positifs. De même, il est nécessaire d'évaluer l'amplification non spécifique de mutations du gène KRAS non ciblées par la trousse, afin de démontrer que la quantité de réactivité croisée entre les réactions de mutation ne produit pas des appels de mutation erronés en présence de quantités excessives d'ADN mutant. Étant donné que la concentration initiale d'ADN pour ce dosage est basée sur la plage de valeurs de C_T de la réaction témoin (21,92 à 32,00), la concentration initiale d'ADN la plus élevée est basée sur une valeur de C_T de la réaction témoin d'environ 22. Des échantillons cliniques FFPE et de l'ADN de lignées cellulaires FFPE ont été utilisés pour cette évaluation.

Amplification/réactivité croisée non spécifique : l'ADN du gène KRAS de type sauvage

La quantité d'amplification non spécifique de l'ADN de type sauvage dans les mélanges réactionnels conçus pour amplifier les mutations spécifiques a été évaluée avec 60 réplicats d'ADN de lignées cellulaires de type sauvage FFPE ou d'ADN extrait de tissu tumoral CCR à la concentration initiale d'ADN amplifiable la plus élevée à l'aide de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Pour l'ADN extrait de lignées cellulaires FFPE, les valeurs de C_T de la réaction témoin étaient d'environ 22 à 23. Les valeurs de C_T de la réaction témoin pour 3 échantillons de CCR de type sauvage se situaient entre 24 et 25. Les résultats ont démontré que les valeurs de ΔC_T dépassaient les valeurs de séparation prédéterminées. Les valeurs moyennes de ΔC_T et/ou les plus basses observées pour chaque réaction sont présentées dans le Tableau 24.

Tableau 24. Les valeurs de ΔC_T les plus basses observées pour chaque réaction de mutation

Réaction de mutation	Valeur de séparation	La plus basse valeur de ΔC_T observée	Échantillon 1 Valeur de ΔC_T moyenne (la plus basse)	Échantillon 2 Valeur de C_T moyenne (la plus basse)	Échantillon 3 Valeur de C_T moyenne (la plus basse)
12ALA	8	12,76	18,00 (11,40)	18,62 (11,50)	20,03 (19,36)
12ASP	6,6	10,35	10,90 (9,62)	10,34 (8,84)	10,68 (9,01)
12ARG	8	14,26	20,33 (12,94)	20,02 (13,20)	20,03 (19,36)
12CYS	8	13,66	20,62 (17,38)	20,29 (19,62)	20,03 (19,36)
12SER	8	11,97	17,26 (11,14)	17,90 (11,42)	18,05 (10,44)
12VAL	7,5	11,81	14,87 (11,46)	16,27 (11,50)	18,68 (11,36)
13ASP	7,5	10,94	12,35 (9,08)	13,68 (10,69)	14,82 (9,97)

Amplification/réactivité croisée/exclusivité non spécifiques : ADN du gène KRAS mutant-positif

Des échantillons mutant-positifs contenant une concentration d'ADN initiale élevée ont été testés avec tous les mélanges réactionnels en préparant les échantillons d'ADN à partir de chacune des lignées cellulaires FFPE de manière à obtenir une valeur de C_T d'environ 23 pour la réaction témoin. Six réplicats de chaque échantillon mutant-positif ont été évalués.

Le pourcentage de mutation dans l'échantillon variait en fonction du pourcentage de mutations dans l'ADN de lignées cellulaires. Les valeurs moyennes de ΔC_T sont présentées dans le Tableau 25 ci-dessous et démontrent qu'il existe une réactivité croisée entre les réactions de mutation. La mutation 12ALA a été amplifiée et a produit des valeurs de ΔC_T inférieures aux seuils de ΔC_T obtenus pour les réactions des mutations 12CYS, 12SER et 12VAL. La mutation 12VAL a été amplifiée et a produit une valeur de ΔC_T inférieure au seuil de ΔC_T obtenu pour la réaction la mutation 12ALA. Mais dans tous les cas, les résultats démontrent que l'appel de mutation était correct avec la réaction de mutation appariée (c.-à-d., la plus petite valeur de ΔC_T était l'appel de mutation correct). Tous les autres échantillons de test n'ont pas été détectés ou ont dépassé le seuil de ΔC_T .

Tableau 25. Les valeurs de ΔC_T de réactivité croisée entre les réactions de mutation effectuées avec de l'ADN de lignées cellulaires FFPE à des niveaux élevés dans la plage de concentrations initiales d'ADN*

Mutation d'ADN	Valeur de séparation	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1,42	12,66	–	5,81	2,78	6,31	13,21
12ASP	6,6	12,56	2,42	–	–	13,44	11,21	13,55
12ARG	8	13,12	11,56	1,12	11,42	–	13,43	12,66
12CYS	8	14,2	12,48	9,23	0,98	–	7,96	12,88
12SER	8	–	13,39	13,31	–	3,02	12,99	13,97
12VAL	7,5	6,83	–	–	–	13,38	0,28	13,74
13ASP	7,5	–	13,29	13,89	–	–	14,36	4,5

* ΔC_T des réactions appariées sont indiquées en gras. Les cellules vides indiquent l'absence de réaction croisée.
 ΔC_T de réactions croisées situées sous la valeur de séparation sont surlignés.

Répétabilité et reproductibilité

La précision de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a été déterminée à l'aide d'un protocole incorporant des aspects de l'EP12-A et l'EP5-A2 du CLSI. Des échantillons cliniques de CCR ont été utilisés pour cette évaluation.

Un échantillon de type sauvage et un échantillon pour chaque mutation ont été testés avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit par 2 opérateurs à chacun des 3 sites. Ils ont testé tous les échantillons et les témoins en utilisant 3 lots de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit tous les jours, pendant 5 jours, avec 2 séries d’analyses par jour et 2 réplicats de chaque échantillon dans chaque série d’analyses. Les valeurs de C_T et ΔC_T obtenues pour chaque réaction sur chaque échantillon ont également été évaluées par analyse des composants de la variance. La reproductibilité de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a été démontrée pour des échantillons ayant une faible concentration de mutants (3xLD) et des échantillons de type sauvage. Au moins 39 des 40 appels de mutation étaient corrects dans tous les dosages avec plusieurs lots, plates-formes et opérateurs, à la fois dans et entre les expériences de laboratoire. Les estimations de la variance démontrée (1x l’écart-type) avec des échantillons à C50 et 3xLD sont présentées dans le Tableau 26 et le Tableau 27.

Tableau 26. Estimations de la variance entre les dosages et de la précision de la reproductibilité

Dosage	%CV pour le mutant						
	%CV pour la valeur de ΔC_T		Valeur de C_T		%CV pour la valeur de C_T témoin		
	3xLD	C50	3xLD	C50	3xLD	C50	WT
12ALA	13,14	8,32	1,87	2,02	0,97	1,12	1,12
12ASP	12,86	5,87	1,11	1,00	0,90	0,90	1,04
12ARG	10,79	8,04	1,59	1,96	1,24	1,51	1,15
12CYS	17,61	10,83	1,86	2,02	1,54	1,22	1,15
12SER	13,97	10,43	1,71	2,11	0,94	1,19	1,15
12VAL	9,66	15,47	1,52	1,65	1,11	3,74	1,26
13ASP	13,73	9,35	1,91	2,08	1,11	1,41	1,19

Tableau 27. Estimation de précision de la répétabilité

Dosage	%CV pour le mutant						
	%CV pour la valeur de ΔC_T		Valeur de C_T		%CV pour la valeur de C_T témoin		WT
	3xLD	C50	3xLD	C50	3xLD	C50	
12ALA	10,71	7,51	1,69	1,76	0,77	0,90	0,79
12ASP	10,16	4,08	0,93	0,89	0,80	0,76	0,76
12ARG	9,83	8,04	1,21	1,76	0,84	1,33	0,90
12CYS	13,15	8,80	1,31	1,76	1,40	1,01	0,76
12SER	6,76	6,18	1,10	1,48	0,80	0,90	0,90
12VAL	9,21	15,32	1,40	1,42	0,91	3,49	0,94
13ASP	8,67	7,01	1,30	1,65	0,91	1,19	0,97

Le pourcentage estimé des échantillons mutants et de type sauvage testés à 3xLD a été rapporté globalement et pour chacun des sites. Dans toutes les combinaisons de dosages et d'échantillons, au moins 79 des 80 réplicats ont fourni un appel de mutation correct. Le pourcentage total des appels corrects était de 99,6 % (1115/1120), soit 99,6 % (558/560) pour les échantillons mutant-positifs (3xLD) et 99,5 % (557/560) pour les échantillons sans mutation détectée (type sauvage) (Tableau 28).

Tableau 28. Total des appels corrects, %

	Mutation						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Échantillons à 3xLD							
Total	79/80	80/80	80/80	79/80	80/80	80/80	80/80
Échantillons de type sauvage (faible)							
Total	80/80	80/80	79/80	80/80	79/80	79/80	80/80

Variabilité dans la manipulation des échantillons

Pour évaluer la variabilité dans la manipulation des échantillons pendant le processus de test de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, 30 coupes séquentielles de 5 µm ont été préparées à partir de chacun des 10 échantillons de tissus CCR FFPE (3 de type sauvage et 1 par mutation). Les coupes ont été randomisées dans 1 des 3 sites de test, afin que chaque site reçoive 10 coupes par échantillon FFPE (100 coupes au total). Sur les 300 extraits d'ADN testées, 298 échantillons étaient valides. La concordance était de 99,33 % pour les appels de mutation du gène KRAS entre les 3 sites. La variance des valeurs de ΔC_T a été estimée pour chaque dosage, et la contribution entre et dans les sources de laboratoire a été estimée à l'aide d'un modèle d'analyse des composants de la variance (ANOVA). La variance à l'intérieur des sites de tests était la plus élevée pour le test de la mutation 12ASP (0,30). La variance entre les sites de tests était la plus élevée pour le test de la mutation 12SER (0,05). Une comparaison entre les sites des valeurs moyennes de ΔC_T et de l'écart-type correspondant pour les échantillons mutant-positifs et les échantillons de type sauvage a démontré une concordance très étroite des résultats (Tableau 29 et Tableau 30). Les résultats démontrent la concordance de la procédure d'extraction d'ADN et du traitement des échantillons avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Tableau 29. Comparaison entre les sites des valeurs moyennes de ΔC_T (écart-type) pour les échantillons mutant-positifs

	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Site	2,44 (0,1)	3,03 (0,6)	2,62 (0,3)	2,24 (0,1)	2,34 (0,3)	2,51 (0,1)	3,93 (0,4)
Site 2	2,44 (0,2)	3,01 (0,7)	2,52 (0,4)	2,29 (0,2)	2,10 (0,4)	2,44 (0,5)	4,15 (0,7)
Site 3	2,67 (0,6)	3,07 (0,5)	2,52 (0,2)	2,29 (0,2)	2,74 (0,5)	2,56 (0,2)	3,95 (0,3)

Tableau 30. Comparaison entre les sites des valeurs moyennes de ΔC_T (écart-type) pour les échantillons de type sauvage

	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Site	12,46 (0,3)	10,37 (0,4)	–	–	11,84 (0,4)	12,36 (0,5)	11,11 (0,6)
Site 2	12,09 (0,6)	10,17 (0,5)	13,07 (0,2)	–	11,71 (0,7)	12,20 (0,6)	11,00 (0,9)
Site 3	12,07 (0,2)	10,61 (0,4)	–	–	11,94 (0,3)	12,28 (0,6)	11,82 (0,5)

Remarque : « – » indique une valeur manquante en raison de l'absence de rupture observée.

Interchangeabilité des lots

La possibilité que la variabilité entre les lots affecte la détection des mutations a été évaluée. Cette étude a évalué 3 lots de la trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit et la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit avec chaque lot de trousse d'extraction d'ADN de tissu FFPE correspondant. L'ADN a été extrait à partir de lignées cellulaires fixées dans le formaldéhyde et enrobées dans la paraffine avec 3 lots de trousse d'extraction d'ADN de tissu FFPE pour produire des échantillons d'ADN produisant les valeurs de C_T cibles d'environ 23, 26 et 31 pour la réaction témoin. Ces valeurs de C_T ont été sélectionnées pour couvrir la plage de travail prédéfinie de concentrations initiales d'ADN pour la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (valeurs de C_T de 21,92 à 32,00 pour la réaction témoin). Six réplicats d'extraits pour chacune des valeurs de C_T cibles ont été testés avec chacun des 3 lots indépendants de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Les valeurs de ΔC_T et les appels de mutation ont été recueillis pour tous les échantillons de test. Les objectifs prédéfinis de l'étude ont été atteints avec un appel de mutation correct observé dans 100 % des tests valides, ce qui confirme que l'appel de mutation des échantillons n'est pas affecté par l'utilisation de différents lots de trousse d'extraction d'ADN de tissu FFPE et/ou de trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits.

Les caractéristiques des performances pour les échantillons de CPNPC

Les performances analytiques

Limite de détection (LD)

Les valeurs de LD pour la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ont été précédemment déterminées à l'aide d'ADN extrait de lignées cellulaires FFPE. L'objectif de cette étude était de vérifier à nouveau que la LD de chacun des dosages de mutation avec des échantillons de CPNPC est inférieure ou égale à 10 % d'ADN mutant dans le bruit de fond de l'ADN génomique de type sauvage, lorsque la concentration d'ADN n'est pas un facteur limitant. La révérification de la LD a été effectuée à l'aide d'un mélange d'échantillons de lignées cellulaires contenant les mutations 12ALA, 12SER et 13ASP et d'échantillons cliniques de CPNPC FFPE contenant les mutations 12ASP, 12ARG, 12CYS et 12VAL. Dans une étude de suivi, des échantillons cliniques contenant les mutations 12ALA, 12SER et 13ASP ont été utilisés. L'ADN extrait des échantillons de tests mutant-positifs et des échantillons de type sauvage (utilisés comme diluant) ont été normalisés à une concentration initiale d'ADN moyenne. Ensuite, les échantillons mutant-positifs ont été dilués à de faibles concentrations d'ADN mutant (défini comme étant la LD précédemment déterminée). Des échantillons d'ADN mutant-positifs ont été testés avec le mélange réactionnel des témoins et le mélange réactionnel de chaque mutation pertinente. Pour les échantillons de CPNPC dilués à la concentration de mutants de la LD, la limite supérieure de l'intervalle de confiance exact bilatéral à 95 % pour le taux de détection des échantillons mutant-positifs observé était supérieure ou égale à 95 %, ce qui a confirmé les valeurs LD pour les échantillons de CCR présentées dans le Tableau 19.

Équivalence de l'acquisition des échantillons

Le but de cette étude était de déterminer si l'appel de mutation pour les échantillons de CPNPC déterminés avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est affecté par la méthode d'acquisition d'échantillons. Les 3 méthodes d'acquisition des échantillons évaluées dans cette étude étaient la résection, la ponction à l'aiguille fine (PAF) et la biopsie au trocart (BT).

Pour cette étude, les échantillons de BT et de PAF « appariés par patient » étaient dérivés d'échantillons de tumeurs réséquées (RES) par intervention chirurgicale afin de permettre le prélèvement d'échantillons de la même tumeur par les 3 méthodes d'acquisition. Chaque échantillon a été extrait et analysé avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

L'analyse principale était basée sur la détection de la mutation spécifique entre les types d'acquisition. Le pourcentage de concordance globale, le pourcentage de concordance positive et le de pourcentage de concordance négative ont été calculés, avec les limites exacts de l'intervalle de confiance bilatéral à 95 %, pour chaque comparaison par paire (Tableau 31).

Tableau 31. Concordance entre les méthodes d'acquisition des échantillons

Comparaison	Concordance	Fréquences	Pourcentage (%)	Limite inférieure de l'intervalle de confiance bilatérale	Limite supérieure de l'intervalle de confiance bilatérale à 95 %
BT vs. PAF avec BT comme référence	Pourcentage de concordance globale	148/156	94,87	90,15	97,76
	Pourcentage de concordance positive	29/35	82,86	66,35	93,44
	Pourcentage de concordance négative	119/121	98,35	94,16	99,80
BT vs. RES avec BT comme référence	Pourcentage de concordance globale	153/161	95,03	90,44	97,83
	Pourcentage de concordance positive	31/37	83,78	67,99	93,81
	Pourcentage de concordance négative	122/124	98,39	94,30	99,80
PAF vs. BT avec PAF comme référence	Pourcentage de concordance globale	148/156	94,87	90,15	97,76
	Pourcentage de concordance positive	29/32	90,63	74,98	98,02
	Pourcentage de concordance négative	119/124	95,97	90,84	98,68
PAF vs RES avec PAF comme référence	Pourcentage de concordance globale	152/156	97,44	93,57	99,30
	Pourcentage de concordance positive	30/32	93,75	79,19	99,23
	Pourcentage de concordance négative	122/124	98,39	94,30	99,80

Suite du tableau à la page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 31. Concordance entre les méthodes d’acquisition des échantillons (suite)

Comparaison	Concordance	Fréquences	Pourcentage (%)	Limite inférieure de l'intervalle de confiance bilatérale	Limite supérieure de l'intervalle de confiance bilatérale à 95 %
RES vs. BT avec RES comme référence	Pourcentage de concordance globale	153/161	95,03	90,44	97,83
	Pourcentage de concordance positive	31/34	91,18	76,32	98,14
	Pourcentage de concordance négative	122/127	96,06	91,05	98,71
RES vs. PAF avec RES comme référence	Pourcentage de concordance globale	152/156	97,44	93,57	99,30
	Pourcentage de concordance positive	30/32	93,75	79,19	99,23
	Pourcentage de concordance négative	122/124	98,39	94,30	99,80

De plus, une analyse de régression de Passing-Bablok et Deming a été effectuée pour comparer les valeurs de τ et de ΔC_T entre les différentes méthodes d’acquisition des échantillons. L’analyse de régression n’a démontré aucune preuve suggérant une différence constante ou proportionnelle entre les valeurs de τ ou de ΔC_T des échantillons de RES, BT et PAF. Une analyse de régression linéaire a également été effectuée pour étudier l’effet du pourcentage de tissu nécrotique et du pourcentage de tissu tumoral sur les valeurs de ΔC_T (Tableau 32). La pente de la régression du pourcentage de tissu nécrotique et du pourcentage de tissu tumoral en fonction de la valeur de ΔC_T n’indique aucune preuve suggérant une différence significative entre les valeurs de ΔC_T avec l’augmentation du pourcentage de tissu nécrotique ou de tissu tumoral.

Tableau 32. Analyse de régression linéaire évaluant l'effet de la nécrose des tissus CPNPC sur les valeurs de ΔCT

Type d'échantillon		Degrés de liberté	Estimation des paramètres	Erreur type	Valeur de t	Pr > t
Résection	Intersection	1	2,58180	0,22476	11,49	<0,0001
	% de tissu nécrotique	1	0,00070754	0,01011	0,07	0,9447
BT	Intersection	1	3,53032	0,36056	9,79	<0,0001
	% de tissu nécrotique	1	-0,01687	0,02059	-0,82	0,4181
P	Intersection	1	1,79792	0,28448	6,32	<0,0001
	% de tissu nécrotique	1	-0,00743	0,02237	-0,33	0,7420

Répétabilité et reproductibilité

La précision de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dans un laboratoire (répétabilité) a été évaluée. L'exactitude des résultats de mutation et la précision des valeurs de ΔCT (la différence entre les valeurs de CT d'une réaction de mutation et de la réaction témoin) sont rapportées.

Au total, 15 ensembles de mutants, un pour chacune des 7 mutations détectées par la trousse KRAS (à LD et 2xLD), et un ensemble de type sauvage (WT) ont été préparés. Les ensembles de mutations étaient représentés par une lignée cellulaire FFPE ou un échantillon clinique, selon la disponibilité. Tous les échantillons ont été normalisés à une valeur de C_T de 27 pour la réaction témoin et les échantillons mutant-positifs ont été dilués avec de l'ADN de type sauvage afin de produire des volumes suffisants d'échantillons à des concentrations de mutation de 1xLD et 2xLD.

La proportion d'appels corrects est présentée dans le Tableau 33 pour chaque ensemble de tests et les valeurs de précision quantitatives sont présentées dans le Tableau 34.

Tableau 33. Pourcentage d'appels de mutations corrects

Variables de regroupement		Pourcentage		Limite de l'intervalle de confiance bilatérale à 95 %	
Concentration des échantillons	Dosage	Fraction	Pourcentage	La plus faible	La plus élevée
2xLD	12ALA	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
	12ARG*	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
	12ASP	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
	12CYS	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
	12SER*	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
	12VAL	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
	13ASP*	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
LD	12ALA	39/40	97,50 %	86,84 %	99,94 %
	12ARG	40/40	100,00 %	91,19 %	100,00 %
	12ASP	40/40	100,00 %	91,19 %	100,00 %
	12CYS	40/40	100,00 %	91,19 %	100,00 %
	12SER*	40/40	100,00 %	91,19 %	100,00 %
	12VAL	40/40	100,00 %	91,19 %	100,00 %
	13ASP*	38/40	95,00 %	83,08 %	99,39 %
WT	Tous	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %

* Représentés par une lignée cellulaire FFPE

Tableau 34. Composants de la variance en termes d'ÉT et de %CV – Répétabilité

Variable de l'analyse	Concentration des échantillons	Dosage	N ^{bre} d'observations	Moyenne	Entre les jours*	Entre les séries d'analyse*	Entre les RGQ*	Entre les lots de trousse	Entre les opérateurs*	Résiduel*	Total
Valeur de CT delta	2xLD	12ALA	28	5,54	[0,0000, 0,00 %]	[0,1221, 2,20 %]	[0,0443, 0,80 %]	[0,0385, 0,70 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1335, 2,41 %]	[0,1843, 3,33 %]
		12ARG	28	4,80	[0,0000, 0,00 %]	[0,1891, 3,94 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,3244, 6,76 %]	[0,3737, 7,79 %]
		12ASP	28	4,72	[0,0860, 1,82 %]	[0,1446, 3,06 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1463, 3,10 %]	[0,1374, 2,91 %]	[0,1751, 3,71 %]	[0,2797, 5,93 %]
		12CYS	28	5,66	[0,0563, 0,99 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0995, 1,76 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0390, 0,69 %]	[0,2306, 4,08 %]	[0,2498, 4,41 %]
		12SER	28	5,36	[0,1429, 2,67 %]	[0,0274, 0,51 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0647, 1,21 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1753, 3,27 %]	[0,2129, 3,97 %]
		12VAL	28	4,26	[0,0000, 0,00 %]	[0,1016, 2,39 %]	[0,0593, 1,39 %]	[0,1128, 2,65 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2095, 4,92 %]	[0,2457, 5,77 %]
		13ASP	28	5,23	[0,0000, 0,00 %]	[0,2892, 5,53 %]	[0,0157, 0,30 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2171, 4,15 %]	[0,3575, 6,83 %]
	LD	12ALA	40	6,36	[0,0000, 0,00 %]	[0,1584, 2,49 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2346, 3,69 %]	[0,2819, 4,43 %]
		12ARG	40	5,45	[0,0036, 0,07 %]	[0,1639, 3,01 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0797, 1,46 %]	[0,1674, 3,07 %]	[0,2397, 4,40 %]
		12ASP	40	4,73	[0,0000, 0,00 %]	[0,2485, 5,25 %]	[0,1087, 2,30 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0816, 1,72 %]	[0,1041, 2,20 %]	[0,2837, 6,00 %]
		12CYS	40	6,62	[0,1688, 2,55 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2056, 3,11 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2909, 4,40 %]	[0,3652, 5,52 %]
		12SER	40	6,37	[0,1006, 1,58 %]	[0,3153, 4,95 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0340, 0,53 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2253, 3,54 %]	[0,3854, 6,05 %]
		12VAL	40	5,13	[0,2874, 5,60 %]	[0,0976, 1,90 %]	[0,0227, 0,44 %]	[0,0874, 1,71 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1629, 3,18 %]	[0,2965, 5,78 %]
		13ASP	38	6,26	[0,3433, 5,48 %]	[0,1227, 1,96 %]	[0,0778, 1,24 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,3459, 5,52 %]	[0,4738, 7,57 %]

* ÉT, %CV

Suite du tableau à la page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 34. Composants de la variance en termes d'ÉT et de %CV – Répétabilité (suite)

Variable de l'analyse	Concentration des échantillons	Dosage	N ^{les} d'observations	Moyenne	Entre les jours*	Entre les séries d'analyse*	Entre les RGQ*	Entre les lots de trousse	Entre les opérateurs*	Résiduel*	Total
Valeur de CT vert	2xLD	12ALA	28'	32,09	(0,0000, 0,00 %)	(0,1314, 0,41 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0675, 0,21 %)	(0,1073, 0,33 %)	(0,1158, 0,36 %)	(0,1957, 0,61 %)
		12ARG	28	31,50	(0,0000, 0,00 %)	(0,2598, 0,82 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,3324, 1,06 %)	(0,4189, 1,33 %)
		12ASP	28	31,30	(0,0000, 0,00 %)	(0,1891, 0,60 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0920, 0,29 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1800, 0,58 %)	(0,2667, 0,85 %)
		12CYS	28	32,07	(0,0000, 0,00 %)	(0,2523, 0,79 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1606, 0,50 %)	(0,2011, 0,63 %)	(0,1512, 0,47 %)	(0,3388, 1,06 %)
		12SER	28	32,06	(0,0000, 0,00 %)	(0,2049, 0,64 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1250, 0,39 %)	(0,1177, 0,37 %)	(0,1263, 0,39 %)	(0,2648, 0,83 %)
		12VAL	28	30,65	(0,0000, 0,00 %)	(0,1772, 0,58 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1198, 0,39 %)	(0,1063, 0,35 %)	(0,1656, 0,54 %)	(0,2639, 0,86 %)
		13ASP	28	31,98	(0,0000, 0,00 %)	(0,3773, 1,18 %)	(0,0497, 0,16 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1813, 0,57 %)	(0,4138, 1,29 %)
	LD	12ALA	40	32,86	(0,0000, 0,00 %)	(0,2332, 0,71 %)	(0,0516, 0,16 %)	(0,0840, 0,26 %)	(0,1319, 0,40 %)	(0,1780, 0,54 %)	(0,3144, 0,96 %)
		12ARG	40	31,90	(0,0000, 0,00 %)	(0,2186, 0,69 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2289, 0,72 %)	(0,1519, 0,48 %)	(0,3106, 0,97 %)
		12ASP	40	31,02	(0,0000, 0,00 %)	(0,1762, 0,57 %)	(0,1093, 0,35 %)	(0,1296, 0,42 %)	(0,2492, 0,80 %)	(0,1005, 0,32 %)	(0,2908, 0,94 %)
		12CYS	40	33,14	(0,1216, 0,37 %)	(0,0493, 0,15 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,3468, 1,05 %)	(0,0501, 0,15 %)	(0,3155, 0,95 %)	(0,4216, 1,27 %)
		12SER	40	33,08	(0,0832, 25 %)	(0,2591, 0,78 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2424, 0,73 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2258, 0,68 %)	(0,3864, 1,17 %)
		12VAL	40	31,62	(0,2858, 0,90 %)	(0,0951, 0,30 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2244, 0,71 %)	(0,0344, 0,11 %)	(0,1763, 0,56 %)	(0,3432, 1,09 %)
		13ASP	38	33,09	(0,3237, 0,98 %)	(0,1009, 0,31 %)	(0,1409, 0,43 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2785, 0,84 %)	0,4133,

* ÉT, %CV

Suite du tableau à la page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 34. Composants de la variance en termes d'ÉT et de %CV – Répétabilité (suite)

Variable de l'analyse	Concentration des échantillons	Dosage	N°e d'observations	Moyenne	Entre les jours*	Entre les séries d'analyse*	Entre les RGQ*	Entre les lots de trousse	Entre les opérateurs*	Résiduel*	Total
Valeur de CT jaune	2xLD	12ALA	28	33,20	(0,0000, 0,00 %)	(0,0515, 0,16 %)	(0,0330, 0,10 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0607, 0,18 %)	(0,2117, 0,64 %)	(0,2235, 0,67 %)
		12ARG	28	33,05	(0,1397, 0,42 %)	(0,1321, 0,40 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2393, 0,72 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,3792, 1,15 %)	(0,4559, 1,38 %)
		12ASP	28	33,00	(0,0597, 0,18 %)	(0,2131, 0,65 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1313, 0,40 %)	(0,1954, 0,59 %)	(0,3059, 0,93 %)
		12CYS	28	33,19	(0,0646, 0,19 %)	(0,0971, 0,29 %)	(0,0233, 0,07 %)	(0,0679, 0,20 %)	(0,0863, 0,26 %)	(0,1943, 0,59 %)	(0,2378, 0,72 %)
		12SER	28	32,85	(0,0525, 0,16 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0337, 0,10 %)	(0,0937, 0,29 %)	(0,1320, 0,40 %)	(0,1588, 0,48 %)
		12VAL	28	33,11	(0,0000, 0,00 %)	(0,1026, 0,31 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1469, 0,44 %)	(0,1469, 0,44 %)	(0,2912, 0,88 %)	(0,3458, 1,04 %)
		13ASP	28	33,03	(0,0000, 0,00 %)	(0,1928, 0,58 %)	(0,1015, 0,31 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1450, 0,44 %)	(0,2493, 0,75 %)
	LD	12ALA	40	33,37	(0,0000, 0,00 %)	(0,2010, 0,60 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1942, 0,58 %)	(0,2177, 0,65 %)	(0,3257, 0,98 %)
		12ARG	40	33,14	(0,0000, 0,00 %)	(0,2168, 0,65 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,3061, 0,92 %)	(0,1637, 0,49 %)	(0,1748, 0,53 %)	(0,3717, 1,12 %)
		12ASP	40	32,98	(0,0000, 0,00 %)	(0,2599, 0,79 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1735, 0,53 %)	(0,2228, 0,68 %)	(0,3618, 1,10 %)
		12CYS	40	33,31	(0,0000, 0,00 %)	(0,2028, 0,61 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1209, 0,36 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2132, 0,64 %)	(0,3050, 0,92 %)
		12SER	40	33,08	(0,1254, 0,38 %)	(0,2847, 0,86 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1505, 0,46 %)	(0,3263, 0,99 %)
		12VAL	40	33,29	(0,3133, 0,94 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2621, 0,79 %)	(0,3574, 1,07 %)
		13ASP	40	33,13	(0,1101, 0,33 %)	(0,1326, 0,40 %)	(0,1666, 0,50 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1925, 0,58 %)	(0,2804, 0,85 %)

* ÉT, %CV

Suite du tableau à la page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 34. Composants de la variance en termes d'ÉT et de %CV – Répétabilité (suite)

Variable de l'analyse	Concentration des échantillons	Dosage	N ^{bre} d'observations	Moyenne	Entre les jours*	Entre les séries d'analyse*	Entre les RGQ*	Entre les lots de trousse	Entre les opérateurs*	Résiduel*	Total
Valeur de CT jaune	WT	12ALA	28	33,41	(0,1443, 0,43 %)	(0,1997, 0,60 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2269, 0,68 %)	(0,3248, 0,97 %)
		12ARG	28	33,30	(0,0875, 0,26 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,4098, 1,23 %)	(0,0904, 0,27 %)	(0,2368, 0,71 %)	(0,3983, 1,20 %)
		12ASP	28	33,12	(0,1591, 0,48 %)	(0,1748, 0,53 %)	(0,0477, 0,14 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2131, 0,64 %)	(0,3075, 0,93 %)
		12CYS	28	33,42	(0,0000, 0,00 %)	(0,2009, 0,60 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1444, 0,43 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2121, 0,63 %)	(0,3077, 0,92 %)
		12SER	28	33,22	(0,2485, 0,75 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0633, 0,19 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1497, 0,45 %)	(0,2517, 0,76 %)
		12VAL	28	33,35	(0,0000, 0,00 %)	(0,2591, 0,78 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1429, 0,43 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2721, 0,82 %)	(0,3863, 1,16 %)
		13ASP	28	33,45	(0,0000, 0,00 %)	(0,1194, 0,36 %)	(0,0526, 0,16 %)	(0,0341, 0,10 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1651, 0,49 %)	(0,2078, 0,62 %)

* ÉT, %CV

La précision de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit entre les laboratoires (reproductibilité) a été évaluée. Trois laboratoires différents (sites de tests) ont été utilisés. Le même ensemble de tests a été utilisé pour cette étude et pour l'étude de répétabilité. À chaque site, les variables des laboratoires étaient les instrument RGQ, les opérateurs, les lots de trousse KRAS et le nombre de série d'analyses par jour, pour un total de 88 séries d'analyse par site pendant 22 jours non consécutifs.

Le pourcentage d'appels de mutation corrects est présenté dans le Tableau 35. Les valeurs de précision quantitatives sont présentées dans le Tableau 36. La reproductibilité globale de la trousse KRAS est indiquée dans la colonne N^{bre} total (ÉT, %CV) du Tableau 36.

Tableau 35. Pourcentage d'appels de mutations corrects de tous les sites

Variables de regroupement		Pourcentage		Limite de l'intervalle de confiance bilatérale à 95 %	
Concentration des échantillons	Dosage	Fraction	Pourcentage	La plus faible	La plus élevée
2xLD	12ALA	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
	12ARG*	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
	12ASP	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
	12CYS	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
	12SER*	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
	12VAL	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
	13ASP*	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
LD	12ALA	118/120	98,33 %	94,11 %	99,80 %
	12ARG	120/120	100,00 %	96,97 %	100,00 %
	12ASP	120/120	100,00 %	96,97 %	100,00 %
	12CYS	120/120	99,17 %	95,44 %	99,98 %
	12SER*	120/120	100,00 %	96,97 %	100,00 %
	12VAL	120/120	100,00 %	96,97 %	100,00 %
	13ASP*	118/120	98,33 %	94,11 %	99,80 %
WT	Tous	82/84	97,62 %	91,66 %	99,71 %

* Représentés par une lignée cellulaire FFPE

Tableau 36. Composants de la variance en termes d'ÉT et de %CV – Reproductibilité

Variable de l'analyse	Concentration des échantillons	Dosage	N ^{bre} d'observations	Moyenne	Entre les sites*	Entre les jours d'un site*	Entre les séries d'analyse d'un site*	Entre les RGQ d'un site*	Entre les lots de troussees d'un site*	Entre les opérateurs d'un site*	Résiduel*	Total
Valeur de CT delta	2xID	12ALA	84	5,48	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1669, 3,05 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1287, 2,35 %)	(0,1679, 3,07 %)	(0,2640, 4,82 %)
		12ARG	84	4,81	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1172, 2,43 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2729, 5,67 %)	(0,2967, 6,16 %)
		12ASP	84	4,57	(0,0000, 0,00 %)	(0,0943, 2,06 %)	(0,1457, 3,19 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0600, 1,31 %)	(0,1718, 3,76 %)	(0,1565, 3,43 %)	(0,2854, 6,25 %)
		12CYS	84	5,61	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2060, 3,67 %)	(0,0264, 0,47 %)	(0,0698, 1,24 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1671, 2,98 %)	(0,2728, 4,87 %)
		12SER	84	5,34	(0,0000, 0,00 %)	(0,1362, 2,55 %)	(0,1669, 3,13 %)	(0,1527, 2,86 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2020, 3,79 %)	(0,2382, 4,46 %)	(0,3902, 7,31 %)
		12VAL	84	4,13	(0,0874, 2,11 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1677, 4,06 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0869, 2,10 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2711, 6,56 %)	(0,3359, 8,12 %)
		13ASP	84	5,22	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2161, 4,14 %)	(0,2712, 5,20 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1930, 3,70 %)	(0,2275, 4,36 %)	(0,4279, 8,20 %)
ID		12ALA	119	6,33	(0,0000, 0,00 %)	(0,0410, 0,65 %)	(0,1207, 1,91 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0247, 0,39 %)	(0,2640, 4,17 %)	(0,2936, 4,64 %)
		12ARG	120	5,42	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1797, 3,31 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1872, 3,45 %)	(0,2590, 4,78 %)
		12ASP	120	4,66	(0,1183, 2,54 %)	(0,0646, 1,38 %)	(0,2121, 4,55 %)	(0,0261, 0,56 %)	(0,0217, 0,46 %)	(0,0440, 0,94 %)	(0,1455, 3,12 %)	(0,2862, 6,14 %)
		12CYS	120	6,54	(0,0000, 0,00 %)	(0,0132, 0,20 %)	(0,1775, 2,72 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1621, 2,48 %)	(0,1708, 2,61 %)	(0,4202, 6,43 %)	(0,4981, 7,62 %)
		12SER	120	6,28	(0,0000, 0,00 %)	(0,0824, 1,31 %)	(0,2271, 3,62 %)	(0,0775, 1,24 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2383, 3,80 %)	(0,3164, 5,04 %)	(0,4570, 7,28 %)
		12VAL	120	5,05	(0,0315, 0,62 %)	(0,1648, 3,26 %)	(0,0955, 1,89 %)	(0,0703, 1,39 %)	(0,0320, 0,63 %)	(0,0795, 1,57 %)	(0,2120, 4,20 %)	(0,2965, 5,87 %)
		13ASP	118	6,17	(0,0000, 0,00 %)	(0,1673, 2,71 %)	(0,1987, 3,22 %)	(0,2332, 3,78 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0843, 1,37 %)	(0,3075, 4,99 %)	(0,4488, 7,28 %)

** ÉT, %CV)

Suite du tableau à la page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 36. Composants de la variance en termes d'ÉT et de %CV – Reproductibilité (suite)

Variable de l'analyse	Concentration des échantillons	Dosage	N ^o d'observations	Moyenne	Entre les sites*	Entre les jours d'un site*	Entre les séries d'analyse d'un site*	Entre les RGQ d'un site*	Entre les lots de trousses d'un site*	Entre les opérateurs d'un site*	Résiduel*	Total
Valeur de CT vert	24D	12ALA	84	32,13	(0,1578, 0,49 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2509, 0,78 %)	(0,0745, 0,23 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1249, 0,39 %)	(0,1362, 0,42 %)	(0,3390, 1,06 %)
		12ARG	84	31,61	(0,0882, 0,28 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2430, 0,77 %)	(0,1339, 0,42 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2604, 0,82 %)	(0,3828, 1,21 %)
		12ASP	84	31,24	(0,1655, 0,53 %)	(0,0391, 0,13 %)	(0,2178, 0,70 %)	(0,0600, 0,19 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2052, 0,66 %)	(0,1426, 0,46 %)	(0,3542, 1,13 %)
		12CYS	84	32,15	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2836, 0,88 %)	(0,0852, 0,26 %)	(0,0940, 0,29 %)	(0,1658, 0,52 %)	(0,1318, 0,41 %)	(0,3636, 1,13 %)
		12SER	84	32,14	(0,1457, 0,45 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2659, 0,83 %)	(0,1807, 0,56 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2715, 0,84 %)	(0,1783, 0,55 %)	(0,4554, 1,42 %)
		12VAL	84	30,69	(0,0646, 0,21 %)	(0,0480, 0,16 %)	(0,2124, 0,69 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1031, 0,34 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2000, 0,65 %)	(0,3143, 1,02 %)
		13ASP	84	32,12	(0,2111, 0,66 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,3218, 1,00 %)	(0,2966, 0,92 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1743, 0,54 %)	(0,1980, 0,62 %)	(0,5184, 1,61 %)
D		12ALA	119	32,93	(0,0000, 0,00 %)	(0,1524, 0,46 %)	(0,1821, 0,55 %)	(0,1048, 0,32 %)	(0,0757, 0,23 %)	(0,1007, 0,31 %)	(0,2526, 0,77 %)	(0,3721, 1,13 %)
		12ARG	120	31,98	(0,0000, 0,00 %)	(0,0743, 0,23 %)	(0,1936, 0,61 %)	(0,1262, 0,39 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1332, 0,42 %)	(0,1619, 0,51 %)	(0,3096, 0,97 %)
		12ASP	120	31,06	(0,1880, 0,61 %)	(0,1184, 0,38 %)	(0,1681, 0,54 %)	(0,1033, 0,33 %)	(0,1171, 0,38 %)	(0,1481, 0,48 %)	(0,1333, 0,43 %)	(0,3511, 1,13 %)
		12CYS	120	33,19	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2513, 0,76 %)	(0,0776, 0,23 %)	(0,2128, 0,64 %)	(0,1427, 0,43 %)	(0,2712, 0,82 %)	(0,4401, 1,33 %)
		12SER	120	33,13	(0,2194, 0,66 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2433, 0,73 %)	(0,1263, 0,38 %)	(0,1470, 0,44 %)	(0,1973, 0,60 %)	(0,2052, 0,62 %)	(0,4437, 1,34 %)
		12VAL	120	31,65	(0,0000, 0,00 %)	(0,1254, 0,40 %)	(0,1645, 0,52 %)	(0,1307, 0,41 %)	(0,1271, 0,40 %)	(0,0976, 0,31 %)	(0,1792, 0,57 %)	(0,3159, 1,00 %)
		13ASP	118	33,08	(0,0000, 0,00 %)	(0,1789, 0,54 %)	(0,1661, 0,50 %)	(0,3569, 1,08 %)	(0,0649, 0,20 %)	(0,1565, 0,47 %)	(0,2588, 0,78 %)	(0,4894, 1,48 %)

** ÉT, %CV)

Suite du tableau à la page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 36. Composants de la variance en termes d'ÉT et de %CV – Reproductibilité (suite)

Variable de l'analyse	Concentration des échantillons	Dosage	N ^o d'observations	Moyenne	Entre les sites*	Entre les jours d'un site*	Entre les séries d'analyse d'un site*	Entre les RGQ d'un site*	Entre les lots de trousses d'un site*	Entre les opérateurs d'un site*	Résiduel*	Total
Valeur de CT jaune	24D	12ALA	84	33,25	(0,0706, 0,21 %)	(0,0399, 0,12 %)	(0,1314, 0,40 %)	(0,1303, 0,39 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1124, 0,34 %)	(0,1913, 0,58 %)	(0,2883, 0,87 %)
		12ARG	84	33,07	(0,0000, 0,00 %)	(0,1406, 0,43 %)	(0,1353, 0,41 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2024, 0,61 %)	(0,1262, 0,38 %)	(0,2831, 0,86 %)	(0,4016, 1,21 %)
		12ASP	84	32,98	(0,0000, 0,00 %)	(0,0480, 0,15 %)	(0,1706, 0,52 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0797, 0,24 %)	(0,1795, 0,54 %)	(0,2616, 0,79 %)
		12CYS	84	33,20	(0,0000, 0,00 %)	(0,0976, 0,29 %)	(0,1781, 0,54 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1454, 0,44 %)	(0,1723, 0,52 %)	(0,2939, 0,89 %)
		12SER	84	32,91	(0,0000, 0,00 %)	(0,1101, 0,33 %)	(0,0549, 0,17 %)	(0,0669, 0,20 %)	(0,0677, 0,21 %)	(0,1186, 0,36 %)	(0,2274, 0,69 %)	(0,2916, 0,89 %)
		12VAL	84	33,17	(0,0688, 0,21 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1896, 0,57 %)	(0,0937, 0,28 %)	(0,1140, 0,34 %)	(0,1311, 0,40 %)	(0,2605, 0,79 %)	(0,3768, 1,14 %)
		13ASP	84	33,10	(0,0000, 0,00 %)	(0,0482, 0,15 %)	(0,2035, 0,61 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0466, 0,14 %)	(0,1460, 0,44 %)	(0,1688, 0,51 %)	(0,3019, 0,91 %)
D		12ALA	119	33,33	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2108, 0,63 %)	(0,0820, 0,25 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1443, 0,43 %)	(0,2253, 0,68 %)	(0,3411, 1,02 %)
		12ARG	120	33,15	(0,1092, 0,33 %)	(0,0537, 0,16 %)	(0,1605, 0,48 %)	(0,0507, 0,15 %)	(0,2157, 0,65 %)	(0,1276, 0,39 %)	(0,2180, 0,66 %)	(0,3749, 1,13 %)
		12ASP	120	32,96	(0,0000, 0,00 %)	(0,0832, 0,25 %)	(0,2022, 0,61 %)	(0,0864, 0,26 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1117, 0,34 %)	(0,2223, 0,67 %)	(0,3343, 1,01 %)
		12CYS	120	33,26	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2232, 0,67 %)	(0,1691, 0,51 %)	(0,0789, 0,24 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2097, 0,63 %)	(0,3516, 1,06 %)
		12SER	120	33,01	(0,1573, 0,48 %)	(0,0716, 0,22 %)	(0,2134, 0,65 %)	(0,0951, 0,29 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0784, 0,24 %)	(0,1689, 0,51 %)	(0,3263, 0,99 %)
		12VAL	120	33,25	(0,1519, 0,46 %)	(0,1960, 0,59 %)	(0,1272, 0,38 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1298, 0,39 %)	(0,0553, 0,17 %)	(0,2162, 0,65 %)	(0,3487, 1,05 %)
		13ASP	118	33,16	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1768, 0,53 %)	(0,0998, 0,30 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1973, 0,59 %)	(0,2802, 0,84 %)

** ÉT, %CV)

Suite du tableau à la page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 36. Composants de la variance en termes d'ÉT et de %CV – Reproductibilité (suite)

Variable de l'analyse	Concentration des échantillons	Dosage	N° d'observations	Moyenne	Entre les sites*	Entre les jours d'un site*	Entre les séries d'analyse d'un site*	Entre les RGQ d'un site*	Entre les lots de trousseaux d'un site*	Entre les opérateurs d'un site*	Résiduel*	Total
WT	12ALA	84	33,44	(0,1257, 0,38 %)	(0,0961, 0,29 %)	(0,1845, 0,55 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2083, 0,62 %)	(0,3104, 0,93 %)	
	12ARG	84	33,37	(0,1191, 0,36 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1869, 0,56 %)	(0,1321, 0,40 %)	(0,2529, 0,76 %)	(0,1205, 0,36 %)	(0,2132, 0,64 %)	(0,4217, 1,26 %)	
	12ASP	84	33,16	(0,0574, 0,17 %)	(0,0738, 0,22 %)	(0,2162, 0,65 %)	(0,0563, 0,17 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1844, 0,56 %)	(0,2997, 0,90 %)	
	12CYS	84	33,42	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1964, 0,59 %)	(0,0720, 0,22 %)	(0,1311, 0,39 %)	(0,0262, 0,08 %)	(0,2258, 0,68 %)	(0,3287, 0,98 %)	
	12SER	84	33,20	(0,0812, 0,24 %)	(0,1331, 0,40 %)	(0,1734, 0,52 %)	(0,0329, 0,10 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2009, 0,61 %)	(0,1923, 0,58 %)	(0,3535, 1,06 %)	
	12VAL	84	33,41	(0,0000, 0,00 %)	(0,0695, 0,21 %)	(0,2046, 0,61 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1708, 0,51 %)	(0,1437, 0,43 %)	(0,2339, 0,70 %)	(0,3799, 1,14 %)	
	13ASP	84	33,46	(0,0000, 0,00 %)	(0,0613, 0,18 %)	(0,1802, 0,54 %)	(0,0744, 0,22 %)	(0,0073, 0,02 %)	(0,0969, 0,29 %)	(0,1790, 0,53 %)	(0,2816, 0,84 %)	

Précision clinique

Une étude a été réalisée pour démontrer la concordance entre la détection des mutations par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit et une méthode validée de PCR par gouttelettes digitales (ddPCR). Au total, 319 échantillons ayant produit des résultats par ddPCR et avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ont été analysés pour évaluer le pourcentage de concordance positive (PCP), le pourcentage de concordance négative (PCN) et le pourcentage de concordance globale (PCG).

Les 319 échantillons utilisés dans l'analyse étaient une combinaison d'échantillons cliniques provenant de l'étude clinique Amgen 20170543 et d'échantillons de CPNPC obtenus. Pour les deux méthodes, les échantillons produisant un résultat autre que la mutation G12C ont été considérés comme étant mutant-négatifs pour cette analyse. Sur les 319 échantillons, les résultats de 5 échantillons n'étaient pas valides par ddPCR.

Les PCG, PCN et PCP, ainsi que les intervalles de confiance (IC) bilatéraux à 95 % correspondants, sont présentés dans Tableau 37. Le PCG était de 97,45 %. Les résultats sont résumés dans le Tableau 38.

Tableau 37. Comparaison des PCG, PCN et PCP obtenus avec la trousse KRAS et par ddPCR (intervalle de confiance bilatéral à 95 %)

Variables de regroupement	Pourcentage		Limite de l'intervalle de confiance bilatérale à 95 %	
Groupe	Fraction	Pourcentage	La plus faible	La plus élevée
Pourcentage de concordance globale (PCG)	306 / 314	97,45 %	95,04 %	98,89 %
Pourcentage de concordance positive (PCP)	149 / 150	99,33 %	96,34 %	99,98 %
Pourcentage de concordance négative (PCN)	157 / 164	95,73 %	91,40 %	98,27 %

Tableau 38. Tableau des fréquence 2x2 avec la trousse KRAS par rapport au ddPCR

Résultats de la trousse <i>therascreen</i> KRAS pour la mutation G12C		Résultats du ddPCR pour la mutation G12C		
Fréquence	G12C	G12C non détecté	Non valide	Total
G12C	149	7	4	160
G12C non détecté	1	157	1	159
Total	150	164	5	319

Amplification non spécifique

L'objectif de cette étude était d'évaluer le niveau d'amplification du bruit de fond dans les échantillons de type sauvage ayant la plus forte concentration initiale d'ADN dans la plage de travail. À des concentrations initiales d'ADN élevées, les valeurs de ΔC_T observées pour une amplification non spécifique dans les 60 réplicats d'échantillons cliniques du type sauvage étaient supérieures aux valeurs de seuil du mélange réactionnel. La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a déterminé correctement l'absence de mutation (type sauvage) dans les 60 réplicats d'échantillons cliniques du type sauvage.

Effet de la concentration initiale d'ADN

La concentration initiale d'ADN correspond à la concentration totale d'ADN amplifiable du gène *KRAS* (à la fois de type mutant et sauvage) dans un échantillon. Elle est déterminée par la valeur de C_T obtenue pour la réaction témoin. Lorsque des échantillons contenant différentes concentrations initiales d'ADN total contiennent le même pourcentage d'ADN mutant, les valeurs de ΔC_T mesurées (c.-à-d., la différence entre les valeurs de C_T d'une réaction de mutation et de la réaction témoin) demeurent cohérentes. Par conséquent, le résultat de la mutation de l'échantillon ne dépend pas de la concentration initiale d'ADN ou n'est pas influencé par celle-ci.

Cette étude comprenait deux parties. La partie 1 était conçue pour évaluer l'effet de la concentration initiale d'ADN sur les valeurs de ΔC_T . L'ADN extrait de 9 échantillons CPNPC FFPE (4 lignées cellulaires et 5 échantillons cliniques) a été utilisé dans cette étude. Les échantillons ont été dilués à une valeur de C_T d'environ 20,00 à 21,00 pour la réaction témoin. Ensuite, ils ont été utilisés pour préparer un stock d'ADN pour chaque mutation suffisant pour 6 réplicats, qui a été dilué quatre fois par un facteur de 10 fois, afin d'obtenir une valeur de C_T d'environ 32,00 à 33,00 (Tableau 39).

Tableau 39. Série de dilutions pour l'étude évaluant l'effet de la concentration initiale d'ADN sur les valeurs de ΔC_T .

Facteur de dilution	Stock initial	x10 (Dilution 1)	x100 (Dilution 2)	x1000 (Dilution 3)	x10000 (Dilution 4)
Valeur de C_T attendue pour la réaction témoin	Approx. C_T 20,00–21,00	Approx. C_T 23,00–24,00	Approx. C_T 26,00–27,00	Approx. C_T 29,00–30,00	Approx. C_T 32,00–33,00

Cette plage a été conçue pour couvrir la plage de concentrations initiales d'ADN des échantillons (valeur de C_T de 21,92 à 32,00 pour la réaction témoin), y compris un point de dilution à une concentration d'ADN supérieure à la limite acceptable et un point de dilution à une concentration d'ADN inférieure à la limite acceptable. Les 5 concentrations initiales d'ADN préparées pour chaque mutation ont été testées à l'aide du mélange réactionnel des témoins et du mélange réactionnel des mutations correspondant dans la même série d'analyses de PCR.

Des diagrammes de régression linéaire ont été générés afin de montrer les valeurs de ΔC_T obtenues pour chaque type de mutation à toutes les dilutions, dans la plage de travail des valeurs de C_T de la réaction témoin. Les critères d'acceptation de la partie 1 de l'étude ont été respectés pour toutes les mutations, car les pentes de régression linéaire, et les limites des intervalles de confiance bilatérales à 95 % correspondantes pour les 3 dilutions dans la plage de travail de valeurs de C_T de la réaction témoin, se situaient dans la moyenne $\pm 1,96$ fois l'écart-type de reproductibilité calculé dans une étude de répétabilité et de reproductibilité. Les valeurs de ΔC_T sont cohérentes pour l'ensemble de la plage de travail de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit et l'ensemble des dosages, ce qui démontre que la concentration initiale d'ADN n'a aucun effet sur l'appel de mutation des échantillons.

La partie 2 de l'étude était conçue pour évaluer l'effet de la dilution en série d'un échantillon mutant-positif sur l'efficacité de l'amplification, en testant des échantillons ayant différents pourcentages de mutation et une concentration initiale d'ADN élevée (valeur de C_T d'environ 23,00 pour la réaction témoin). L'ADN des stocks d'échantillons cliniques de CPNPC FFPE et de lignées cellulaires FFPE a été dilué à des densités optiques correspondant à des valeurs de C_T d'environ 22,00 à 23,00 pour la réaction témoin. L'ADN mutant a été dilué plusieurs fois par un facteur de 2 avec de l'ADN de type sauvage normalisé pour produire une série de 5 dilutions par échantillon d'ADN mutant contenant des pourcentages de mutation différents (pourcentages de mutant cibles de 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % et 6,25 %).

Le Tableau 40 présente les efficacités d'amplification de chaque dosage. Les efficacités d'amplification de l'ADN de type sauvage, par rapport à l'ADN mutant présent dans un échantillon, n'ont eu aucun effet sur les valeurs de ΔC_T . Par conséquent, l'appel de mutation n'a pas été affecté.

Tableau 40. Efficacité d'amplification de chaque dosage de mutation

Échantillon	Efficacité d'amplification
12ALA	0,921
12ASP	1,034
12ARG	0,916
12CYS	0,988
12SER	1,047
12VAL	1,082
13ASP	1,028*

* Valeur calculée en excluant une valeur aberrante de l'analyse. En incluant la valeur aberrante, l'efficacité d'amplification était de 1,085

Variabilité dans la manipulation des échantillons

Une étude a été réalisée pour démontrer que différents laboratoires produisent les mêmes résultats lors de l'analyse des mêmes échantillons cliniques. Cette étude a utilisé une combinaison d'échantillons de lignées cellulaires FFPE et d'échantillons cliniques CPNPC FFPE. Treize échantillons cliniques de CPNPC FFPE ont été utilisés, soient trois pour la mutation 12ASP, trois pour la mutation 12CYS et quatre pour la mutation 12VAL (total de 10 échantillons de mutation), ainsi que trois échantillons de type sauvage. Quatre échantillons de lignées cellulaires FFPE positifs pour les mutations 12ALA, 12ARG, 12SER et 13ASP ont été utilisés. Les échantillons ont été mis en aveugle de sorte que leur état mutationnel était inconnu des opérateurs de chacun des trois sites de tests. À chacun des trois sites, l'extraction de l'ADN a été réalisée avec 20 coupes FFPE (c.-à.-d., 10 paires) de chaque mutation et de type sauvage. Au total, 314 extractions ont été effectuées aux trois sites. Toutes les préparations d'échantillons des 3 sites testées avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ont fourni un appel de mutation correct pour les échantillons de chacune des sept mutations et pour les échantillons de type sauvage. Dans l'ensemble, les appels pour chacune des sept mutations et les échantillons de type sauvage étaient corrects à 100 %, démontrant une cohérence entre les sites pour la procédure d'extraction de l'ADN et la détection des mutations à l'aide de la trousse KRAS.

Une étude supplémentaire a été menée sur les effets de la manipulation des échantillons en utilisant des échantillons cliniques FFPE et des échantillons cliniques CPNPC positifs pour les mutations 12ALA, 12ARG, 12SER et 13ASP, car l'étude précédente avait utilisé des échantillons de lignées cellulaires positifs pour ces mutations. La conception de cette étude supplémentaire était la même que pour l'étude précédente. Toutes les préparations d'échantillons pour les mutations 12ALA, 12ARG et 13ASP des extraits des 3 sites de test ont fourni un appel de mutation correct avec la trousse KRAS. Dans l'ensemble, les appels pour ces échantillons étaient corrects à 100 %. Des appels de mutation corrects ont été obtenus pour 28 des 30 préparations d'échantillons pour la mutation 12SER (pourcentage d'appel correct de 93,33 %) aux 3 sites de tests. Les résultats démontrent la cohérence de la procédure d'extraction d'ADN et du flux de travail pour le traitement des échantillons avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Interchangeabilité des lots

L'objectif de cette étude était de démontrer que l'utilisation de différents lots de la trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit pour l'extraction des échantillons d'ADN et la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit pour l'analyse des mutations du gène KRAS n'avait aucun effet sur l'état mutationnel d'un échantillon testé. Trois lots de chaque type de trousses ont été utilisés pour tester des échantillons CPNPC FFPE, afin de démontrer que l'utilisation de différents lots de trousses QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit et *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit n'avait aucun effet sur l'état mutationnel des échantillons testés. L'étude a utilisé 24 échantillons CPNPC, 3 échantillons pour chacune des 7 mutations détectées par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, ainsi que 3 échantillons de type sauvage. Chaque échantillon a été extrait à l'aide de 3 lots de la trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Tous les extraits d'ADN ont été testés avec les 3 lots de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dans la même série d'analyses de PCR sur l'instrument RGQ.

Les valeurs de ΔC_T (la différence entre les valeurs de C_T d'une réaction de mutation et de la réaction témoin) et les appels de mutation ont été recueillis pour tous les échantillons de test extraits avec les différentes trousses de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits et testés avec les différentes trousses de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits. Le critère d'acceptation de « au moins 95 % des appels de mutations doivent être corrects pour le pourcentage global » a été respecté, car 100 % des appels étaient corrects pour tous les échantillons de mutation et les échantillons de type sauvage.

Stabilité des coupes FFPE

L'objectif principal de cette étude était de démontrer que les coupes préparées à partir d'échantillons de CPNPC FFPE réséqués étaient stables lorsqu'elles étaient conservées dans l'obscurité à température ambiante. Des coupes ont été préparées à partir de 5 échantillons cliniques CPNPC FFPE positifs pour une mutation KRAS (une pour chacune des mutations 12ALA, 12ASP, 12CYS, 12VAL et 13ASP) et 1 échantillon exprimant le gène KRAS de type sauvage, puis elles ont été conservées jusqu'à leur utilisation. Les coupes ont été testées avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit à cinq points temporels différents sur une période de 75 semaines. L'appel de l'état mutationnel était correct pour tous les échantillons et tous les points temporels. Cette étude a démontré que les coupes FFPE sont stables à température ambiante pendant au moins 75 semaines.

Une deuxième étude a été réalisée pour démontrer que les coupes d'échantillons de CPNPC FFPE obtenus par PAF étaient stables lorsqu'elles étaient conservées dans l'obscurité à température ambiante.

Cette étude a utilisé la technique de PAF afin d'obtenir des échantillons de type sauvage pour les 7 mutations du gène KRAS détectées par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Des coupes ont été préparées à partir de 10 échantillons exprimant le gène KRAS de type sauvage. Ces échantillons ont été extraits avec un lot de la trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. L'ADN a été extrait et testé aux points temporels T0, puis T1 (T0 + 52 semaines), T2 et T3, pour une période supplémentaire de 8 semaines après T1. Les résultats de cette étude démontrent que les échantillons CPNPC FFPE obtenus par PAF sont stables pendant au moins 60 semaines lorsqu'ils sont conservés dans les bonnes conditions.

Substances interférentes

Cette étude a été conçue pour démontrer que la présence d'une substance potentiellement interférente ne produit aucun résultat faux positif ou faux négatif lorsque les tests sont effectués avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Huit (8) substances potentiellement interférentes issues du processus d'extraction de l'ADN ont été identifiées : la paraffine, le xylène, l'éthanol, le Buffer ATL, la protéinase K, le Buffer AL, le Buffer AW1 et le Buffer AW2. Chaque substance a été testée avec de l'ADN extrait de 8 lignées cellulaires FFPE, représentant chacune des 7 mutations détectées par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, et un échantillon de type sauvage. Les échantillons de mutations ont été testés à une concentration correspondant à environ trois fois la limite de détection (3xLD). Les deux analytes (échantillons de mutation et échantillons de type sauvage) ont été enrichis avec chacune des 8 substances interférentes potentielles à 3 concentrations différentes : le transfert attendu le plus élevé (1x), dix fois le transfert attendu le plus élevé (10x) et cent fois le transfert attendu le plus élevé (100x), tel que présenté dans le Tableau 41.

Tableau 41. Concentrations des substances potentiellement interférentes testées avec des tissus CPNPC

Substance interférente	1x quantité maximale estimée dans l'éluat (%)	10x quantité maximale estimée dans l'éluat (%)	100x quantité maximale estimée dans l'éluat (%)
Paraffine	$8,33 \times 10^{-5}$	$8,33 \times 10^{-4}$	$8,33 \times 10^{-3}$
Xylène	$8,33 \times 10^{-5}$	$8,33 \times 10^{-4}$	$8,33 \times 10^{-3}$
Éthanol	$1,67 \times 10^{-3}$	$1,67 \times 10^{-2}$	$1,67 \times 10^{-1}$
Buffer ATL	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-1}$
Protéinase K	$1,67 \times 10^{-4}$	$1,67 \times 10^{-3}$	$1,67 \times 10^{-2}$
Buffer AL	$1,67 \times 10^{-3}$	$1,67 \times 10^{-2}$	$1,67 \times 10^{-1}$
Tampon de lavage (AW1)	$4,17 \times 10^{-2}$	$4,17 \times 10^{-1}$	4,17
Tampon de lavage (AW2)	$4,17 \times 10^{-1}$	4,17	41,7

Afin de les utiliser également comme témoin négatif, les deux analytes ont également été enrichis avec le tampon d'éluat final dans le processus d'extraction de l'ADN, le Buffer ATE. L'étude a démontré que les substances identifiées à partir de la trousse d'extraction d'ADN FFPE et qui pourraient être transférées dans la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit n'ont eu aucun effet néfaste sur les performances du dosage au niveau 1x d'interférence. L'appel de mutation a toujours été correct et la présence de la substance interférente n'a pas eu d'effet statistiquement significatif sur la différence entre les valeurs moyennes de ΔC_T pour la majorité des conditions d'échantillon dosagées (58 conditions sur 64 au niveau 1x). Pour les six échantillons ayant démontré une différence statistiquement significative, la différence observée entre les moyennes pour chaque échantillon respectait le critère d'acceptation de l'étude de $\pm 2 \times \text{ÉT}$ (ÉT estimé tiré d'une étude de reproductibilité).

Une étude supplémentaire a été effectuée pour évaluer l'impact de l'hémoglobine sur la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Dans cette étude, des échantillons cliniques obtenus par résection pour les mutations 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL, 12CYS et 13ASP ont été utilisés. Aucun échantillon clinique n'a été évalué pour le 12SER en raison de la rareté de la mutation. Un échantillon clinique FFPE exprimant le gène *KRAS* de type sauvage a été ajouté à l'ensemble d'échantillons de l'étude pour évaluer toute interférence potentielle dans les échantillons mutant-négatifs. Les échantillons de l'étude ont été enrichis avec deux concentrations différentes d'hémoglobine, soient celles correspondant à la moitié du transfert attendu le plus élevé (0,5x) et au transfert attendu le plus élevé (1x).

La concentration 1x du test (2 g/L) est une recommandation de l'EP07-A2 du CLSI. Cette étude a démontré que la détection des mutations 12ASP, 12ARG, 12VAL, 12CYS et 13ASP par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit n'est pas affectée par une interférence potentielle de l'hémoglobine. Par contre, la détection de la mutation 12ALA par la trousse KRAS est affectée à une concentration d'hémoglobine de 0,50 µg/µl ou plus. L'impact de l'hémoglobine sur la détection de la mutation 12SER est inconnu.

Les performances cliniques

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est conçue pour détecter de manière spécifique 7 mutations dans les codons 12 et 13 de l'oncogène *KRAS*. Elle n'est pas conçue pour détecter spécifiquement une séquence de type sauvage dans ces codons. Les résultats du test sont rapportés sous la forme « [mutation name] Detected » ([nom de la mutation] détecté) et « No Mutation Detected » (Aucune mutation détectée). Dans les études cliniques présentées ci-dessous, les résultats mutants-positifs pour le gène *KRAS* désignent les patients qui possèdent du tissu tumoral positif pour une ou plusieurs des 7 mutations détectées par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S, G12V et G13D). Les résultats mutant-négatifs pour le gène *KRAS* (type sauvage) désignent les patients dont le tissu tumoral était négatif pour les 7 mutations détectées par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (c.-à-d., l'échantillon peut contenir des mutations du gène *KRAS* qui ne sont pas identifiées par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit).

Étude clinique soutenant l'utilisation du sotorasib

Une étude a été menée sur les performances cliniques pour démontrer la validité clinique de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit comme test de diagnostic compagnon pour aider les médecins à identifier les patients atteints d'un CPNPC qui serait indiqué pour le traitement par sotorasib. L'objectif de l'étude était de déterminer si l'état mutationnel G12C, tel que déterminé par la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, peut être utilisé pour sélectionner les patients atteints d'un CPNPC avancé qui bénéficieraient d'un traitement par sotorasib. L'étude clinique 20170543 de phase 1/2 multicentrique et menée en ouvert évalue actuellement l'efficacité et l'innocuité du sotorasib chez des sujets adultes présentant des tumeurs solides avancées porteuses de la mutation G12C du gène *KRAS*. Les données de l'analyse intérimaire de la phase 2 de cette étude sur le CPNPC ont été utilisées pour étayer la validité clinique de la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit comme test de diagnostic compagnon. Le recrutement était limité aux sujets atteints d'un CPNPC porteurs de la mutation G12C du gène *KRAS*, identifiée par un test de laboratoire local, qui a été confirmée dans un laboratoire central avec la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Le critère d'évaluation principal de la phase 2 de cette étude sur le CPNPC était le taux de réponses objectives (TRO) des tumeurs évalué avec les critères d'évaluation des réponses dans les tumeurs solides (RECIST; Response Evaluation Criteria in Solid Tumours, v1.1), version 1.1, au sotorasib administré en monothérapie chez des sujets atteints de tumeurs avancées exprimant la mutation G12C du gène *KRAS*.

Sur un total de 126 sujets atteints de CPNPC, 123 sujets ont été inclus dans l'ensemble complet de l'analyse. Trois sujets ont été exclus parce qu'ils n'avaient pas ≥ 1 tumeur mesurable, selon le comité indépendant de révision mis à l'aveugle (Blinded Independent Review Committee, BIRC). Le critère d'évaluation principal du TRO (réponse complète + réponse partielle), mesuré par tomодensitométrie ou imagerie par résonance magnétique et évalué selon le RECIST version 1.1 par le laboratoire BICR, chez des sujets atteints d'un CPNPC exprimant la mutation G12C du gène *KRAS*, était de 37,4 % (46 des 123 sujets; IC à 95 % : 28,84-46,58). Deux sujets (1,6 %) ont obtenu une réponse complète et 44 sujets (35,8 %) ont obtenu une réponse partielle.





Références



1. Hilger, R.A., Scheulen, M.E., Strumberg, D. (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 25, 511.
2. Bachireddy, P., Bendapudi, P.K., Felsher, D.W. (2005) Getting at MYC through RAS. *Clin. Cancer Res.* 11, 4278.
3. Han, S.-W. et al. (2006) Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and AKT phosphorylation. *Clin. Cancer Res.* 12, 2538.
4. Pao, W. et al. (2005) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Medicine* 2, 57.
5. Livre, A. et al. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 66, 3992.
6. Benvenuti, S. et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* 67, 2643.
7. De Roock, W. et al. (2007) KRAS mutations preclude tumor shrinkage of colorectal cancers treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 25, 4132.
8. Finocchiaro, G. et al. (2007) EGFR, HER2, and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 25, 4021.
9. Di Fiore, F. et al. (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br. J. Cancer* 96, 1166.
10. Khambata-Ford, S. et al. (2007) Expression of Epirigulin and Amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 25, 3230.
11. Lièvre A. et al. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 66, 3992.
12. Lièvre A. et al. (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 26, 374.
13. Bokemeyer, C. et al., (2008) K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.* 26 (May 20 suppl; abstr 4000).

14. Van Cutsem, E. et al. (2008) K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J. Clin. Oncol.* 26, (May 20 suppl; abstr 2).
15. Tejpar, S. et al. (2008) Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J. Clin. Oncol.* 26, (May 20 suppl; abstr 4001).
16. Karapetis, C. et al. (2008). KRAS mutation status is a predictive biomarker for cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG CO.17: A phase III trial of cetuximab versus best supportive care. 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer, June 25-28, 2008. Abstract o-037.
17. Amado, R.G. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 1626.
18. De Roock, W. et al. (2007) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann. Oncol.* 19, 508.
19. Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 28, 3752.
20. Newton, C. R. et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17, 2503.
21. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech* 17, 804.
22. Catalog of Somatic Mutations in Cancer (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Symboles

Les symboles suivants peuvent être apposés sur l’emballage ou les étiquettes :

Symbole	Définition du symbole
 <24>	Contient suffisamment de réactifs pour 24 réactions
	Date limite d’utilisation
REF	Numéro de référence
LOT	Numéro de lot
MAT	Numéro de matériel
COMP	Composants
CONT	Contient
GTIN	Code d’article international
Rn	R désigne une révision du mode d’emploi (manuel) et n représente le numéro de révision
	Limites de température
	Fabricant

Symbole	Définition du symbole
	Consulter le mode d'emploi
	Tenir à l'abri de la lumière du soleil

Coordonnées

Pour obtenir de l'assistance technique ou des renseignements supplémentaires, consultez notre centre d'assistance technique à l'adresse **www.qiagen.com/Support** ou appelez les services techniques QIAGEN ou un distributeur local (reportez-vous à la quatrième de couverture arrière ou au site www.qiagen.com).

Annexe : Installation du progiciel *therascreen* KRAS Assay Package

La trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est conçue pour être utilisée avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM équipé d'un rotor de 72 puits. Le progiciel *therascreen* KRAS Assay Package est disponible par téléchargement sur le site www.qiagen.com.

Remarque : Le progiciel *therascreen* KRAS Assay Package est compatible uniquement avec le logiciel du Rotor-Gene Q version 2.3 (ou plus récente). Assurez-vous que la bonne version du logiciel du Rotor-Gene Q est installée avant de procéder à l'installation du progiciel *therascreen* KRAS Assay Package.

Procédure

1. Téléchargez le fichier *therascreen* KRAS QC locked template à partir du site www.qiagen.com.
2. Placez le fichier sur une clé USB exempte de virus.
3. Insérez la clé USB dans l'ordinateur portable branché à l'instrument Rotor-Gene Q.
4. Faites un clic droit sur le fichier compressé et extrayez-le.
5. Double-cliquez sur le dossier extrait et cliquez sur *therascreen_KRAS_Assay_Package_3.0.3.exe* pour démarrer l'installation.
6. L'assistant de configuration s'affiche. Cliquez sur « Next » (Suivant) pour continuer (Figure 21).

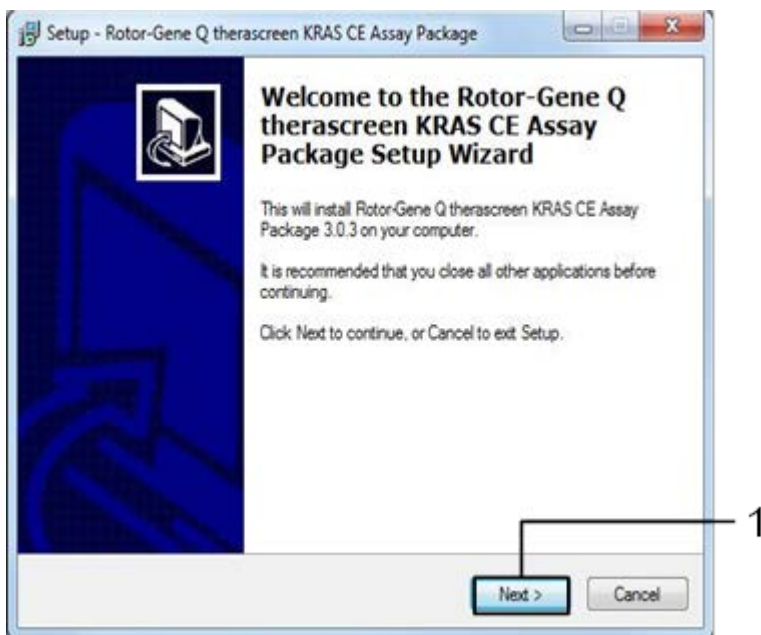


Figure 21. La boîte de dialogue « Setup » (Configuration). 1 = « Next » (Suivant).

7. Lisez le contrat de licence dans la boîte de dialogue « License Agreement » (Contrat de licence), puis cochez la case « I accept the agreement » (J'accepte les termes du contrat de licence) pour accepter. Cliquez sur « Next » (Suivant) pour continuer (Figure 22).

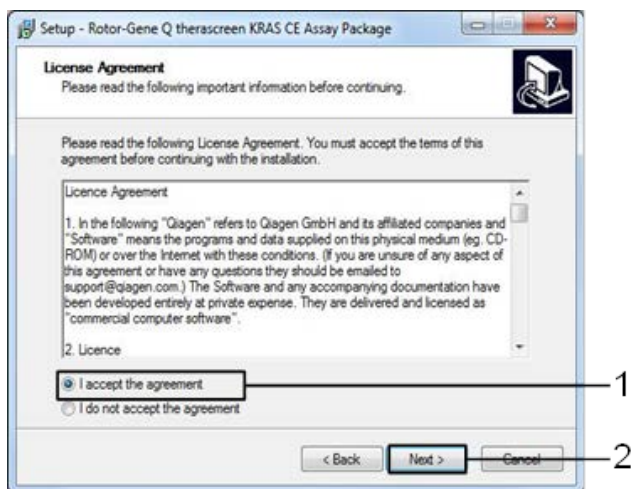


Figure 22. La boîte de dialogue « License Agreement » (Contrat de licence). 1 = la déclaration « I accept the agreement » (J'accepte les termes du contrat de licence); 2 = « Next » (Suivant).

8. La configuration de la matrice commencera automatiquement et la dernière boîte de dialogue « Setup » (Configuration) apparaîtra. Cliquez sur « Finish » (Terminer) pour sortir de l'assistant de configuration (Figure 23).

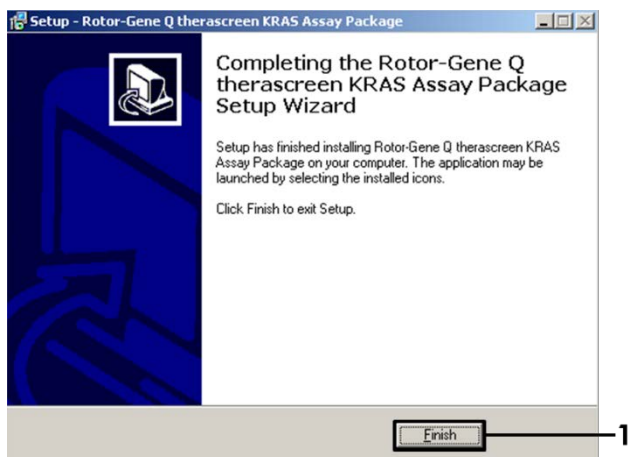


Figure 23. Fin du processus de l'assistant de configuration. 1 = « Finish » (Terminer).

9. Redémarrez l'ordinateur. Des raccourcis vers « therascreen KRAS QC Locked Template » et « therascreen KRAS Locked Template » seront générés automatiquement et apparaîtront sur l'écran de l'ordinateur.

Pour commander

Produit	Table des matières	n° de réf.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	Pour 24 réactions : 1 dosage de témoin, 7 dosages de mutation, 1 témoin positif, eau, <i>Taq</i> ADN polymérase	870041
Instrument Rotor-Gene Q et accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Instrument de real-time PCR et analyseur de fusion haute résolution à 5 canaux (Green, Yellow, Orange, Red, Crimson) plus un canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie de 1 an pièces et main-d'œuvre (installation et formation non comprises)	9002370
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Bloc en aluminium pour la préparation manuelle des réactions avec une pipette simple dans 72 tubes de 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 bandes de 4 tubes avec bouchons pour 1 000 réactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 barrettes de 4 tubes avec bouchons pour 10 000 réactions	981106

Produit	Table des matières	n° de réf.
La trousse QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit – pour la purification de l’ADN génomique des tissus enrobés dans la paraffine		60404
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pour 50 préparations d’ADN : colonnes QIAamp MinElute®, protéinase K, tampons et Collection Tubes (2 ml)	

Pour obtenir des renseignements actualisés et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consultez le manuel du kit ou le manuel d’utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des trousse et les manuels d’utilisation QIAGEN sont disponibles sur www.qiagen.com ou peuvent être demandés aux services techniques QIAGEN ou au distributeur local.

Historique des révisions du document

Historique des révisions du document	
R4 01/2019	Mise à jour de l'adresse du fabricant légal (première page). Mise à jour de la matrice.
R5 Octobre 2021	Mise à jour de la section « Utilisation prévue » par l'ajout de l'utilisation de tissu CPNPC et du sotorasib Mise à jour de la section « Résumé et explication du test » par l'ajout de renseignements sur les patients atteints de CPNPC Modification de la section « Manipulation et conservation des prélèvements » afin de différencier les instructions pour la préparation des échantillons de tissu CCR et CPNPC Ajout de la procédure d'extraction de l'ADN des échantillons de CPNPC Ajout de la section « Les caractéristiques des performances pour les échantillons de CPNPC » Ajout de la section « Les performances cliniques » pour ajouter une description de l'étude clinique étayant l'utilisation du sotorasib

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Contrat de licence limité pour la trousse *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans cette trousse. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans cette trousse avec tout autre composant non fourni dans cette trousse, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Sur ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences expressément énoncées, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que cette trousse et/ou son utilisation ne violent pas les droits de tiers.
3. Cette trousse et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles expressément énoncées.
5. L'acheteur et l'utilisateur de la trousse s'engagent à ne pas prendre, ou autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter des actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions du présent accord de licence limité par tout tribunal et pourra recouvrir tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocat, en cas d'action en application du présent accord ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés à la trousse et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, reportez-vous à www.qiagen.com.

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ARMS® (AstraZeneca Ltd.); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc). Les marques déposées, marques de commerce et autres marques citées dans ce document doivent être considérées comme protégées par la loi, même si elles ne sont pas spécifiquement signalées comme telles.

Ne pas utiliser avec des échantillons de selles.

Ne pas utiliser avec des échantillons d'urine.

Ne pas utiliser avec des acides nucléiques extracellulaires d'échantillons de sang.

Ne pas utiliser avec des échantillons de moelle osseuse sans cellules.

Ne pas utiliser avec des échantillons de salive.

L'ACHAT DE CE PRODUIT CONFÈRE À L'ACQUÉREUR DES DROITS EN VERTU DE CERTAINS BREVETS DE ROCHE POUR UNE UTILISATION UNIQUEMENT À DES FINS DE PRESTATION DE SERVICES DIAGNOSTIQUES HUMAINS IN VITRO. AUCUN BREVET GÉNÉRAL NI AUCUNE AUTRE LICENCE DE QUELQUE TYPE QUE CE SOIT EN DEHORS DE CE DROIT D'UTILISATION SPÉCIFIQUE CONFÉRÉ PAR L'ACHAT N'EST ACCORDÉ PAR LA PRÉSENTE.

HB-1840-005 1123966 10-2021 © 2021 QIAGEN, tous droits réservés.

Commandez sur [**www.qiagen.com/shop**](http://www.qiagen.com/shop) | Assistance technique [**support.qiagen.com**](http://support.qiagen.com) |
Site Web [**www.qiagen.com**](http://www.qiagen.com)