

Novembre 2017

Manuel du kit therascreen[®] PITX2 RGQ PCR



Version 1

IVD

Pour utilisation en diagnostic in vitro

À utiliser avec l'instrument Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

À utiliser avec le kit QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue

À utiliser avec le kit EpiTect[®] Fast DNA Bisulfite

CE

REF

873211



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALLEMAGNE

R1 **MAT**

1107245FR



Sommaire

Utilisation prévue	6
Résumé et description.....	6
Principe de la procédure	7
Matériel fourni.....	12
Contenu du kit.....	12
Matériel nécessaire, mais non fourni	12
Avertissements et précautions	15
Informations de sécurité.....	15
Précautions générales	16
Stockage et manipulation des réactifs.....	19
Conditions d'expédition	19
Conditions de conservation.....	19
Stabilité.....	19
Stockage et manipulation des échantillons	20
Procédure	21
Extraction et préparation de l'ADN génomique.....	21
Déparaffinage de la lame FFPE avec la solution de déparaffinage QIAGEN	22
Extraction manuelle de l'ADNg à l'aide du kit.....	24
Quantification de l'ADN	28
Traitement au bisulfite de l'ADNg à l'aide du kit EpiTect Fast DNA Bisulfite.....	29

Protocole : qPCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	36
Interprétation des résultats.....	55
Analyse des données	55
Affichage des résultats	59
Indicateurs.....	61
Guide de résolution de problèmes	66
Contrôle de la qualité.....	70
Limitations.....	71
Caractéristiques de performance	73
Limite du blanc.....	73
Limite de détection.....	74
Entrée d'ADN	75
Linéarité	76
Répétabilité et reproductibilité.....	76
Substances interférentes	77
Contamination croisée	78
Durée d'utilisation.....	78
Validation du seuil clinique.....	79
Références	81
Symboles.....	83
Coordonnées	84
Pour commander	85

Utilisation prévue

Le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR est un test PCR in vitro en temps réel spécifique de la méthylation destiné à la détermination du rapport de méthylation en pourcentage (percent methylation ratio, PMR) chez le promoteur 2 de la boîte homéotique pituitaire 2 (PITX2). Le test utilise de l'ADN chromosomique (ADNg) traité au bisulfite issu d'un tissu FFPE provenant de patients atteints de cancer du sein à haut risque. Le PMR permettra aux cliniciens de mieux prédire la réponse à la chimiothérapie adjuvante à base d'anthracyclines avec ou sans hormonothérapie chez des patients atteints du cancer du sein avec un haut risque de ganglions lymphatiques positifs, de récepteurs aux œstrogènes positifs et de HER2-négatif.

Le produit est destiné à être utilisé par des utilisateurs qualifiés, tels que des techniciens et des médecins, formés aux techniques de biologie moléculaire et aux procédures de diagnostics in vitro.

Le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR doit être utilisé avec la plate-forme QIAGEN® Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM.

Résumé et description

Le kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue est utilisé pour l'extraction de l'ADN à partir de tissu FFPE. La boîte homéotique pituitaire 2 (PITX2) est un facteur de transcription par la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. La PITX2 fonctionne comme un effecteur de la signalisation Wnt en enrôlant et en interagissant avec le β -caténine pour augmenter l'expression de gènes cibles impliqués dans la prolifération et la migration cellulaire, la progression tumorale et la chimiosensibilité (1-6). L'activité de l'expression du gène PITX2 est régulée par méthylation de la région promotrice par « modification épigénétique ». De petites molécules, comme les « groupes méthyles », sont attachées à la cytosine, une base d'ADN, dans la région promotrice d'un gène. L'activité d'un gène complètement ou partiellement méthylé est régulée

négativement. Dans le cas du cancer du sein, il a été rapporté que le PITX2 est à la fois un marqueur pronostique et un marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie hormonale et à la chimiothérapie à base d'anthracyclines. Plusieurs études cliniques ont montré une forte corrélation statistique entre la méthylation dans la région promotrice du gène PITX2 et les mesures des résultats cliniques comprenant la survie sans progression, la survie sans métastase, la survie sans maladie et la survie globale [7-12].

Le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR est un test PCR spécifique de la méthylation en temps réel (qMSP). Le type d'échantillon est du bisDNA, c'est à dire de l'ADN chromosomique (ADNg) traité au bisulfite. L'ADNg est d'abord extrait du tissu fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE) provenant de patients atteints du cancer du sein avec un haut risque de ganglions lymphatiques positifs, de récepteurs aux œstrogènes positifs et de HER2-négatif. Après traitement au bisulfite afin de distinguer le PITX2 méthylé du PITX2 non méthylé, le rapport de méthylation en pourcentage (PMR) des 3 motifs CpG du promoteur 2 du gène PITX2 est quantifié par qMSP et calculé par le logiciel Rotor-Gene AssayManager® avec le plug-in Gamma et le profil du test PITX2. Le PMR obtenu donnera des informations au médecin traitant afin de savoir si le patient est susceptible de répondre à la chimiothérapie à base d'anthracyclines. Si le PMR obtenu est égal ou inférieur à 12, le patient est susceptible de répondre à la chimiothérapie à base d'anthracyclines. En revanche, si le PMR obtenu est supérieur à 12, un traitement alternatif peut être proposé, puisque le patient a une plus faible probabilité de répondre à la chimiothérapie à base d'anthracyclines (voir « Validation du seuil clinique », page 79).

Principe de la procédure

Le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR utilise la PCR en temps réel (qPCR) pour déterminer le rapport de méthylation en pourcentage (PMR) chez le promoteur 2 du PITX2. Le type d'échantillon pour le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR est de l'ADNg traité au bisulfite. Ce traitement au bisulfite est effectué à l'aide du kit EpiTect Fast DNA Bisulfite(QIAGEN, réf. 59824 ou 59826). L'ADNg utilisé pour ce traitement est extrait du tissu fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE) provenant

de patients de cancer du sein à haut risque à l'aide du kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (réf. 60404). Le flux de travail est représenté sur la Figure 1.

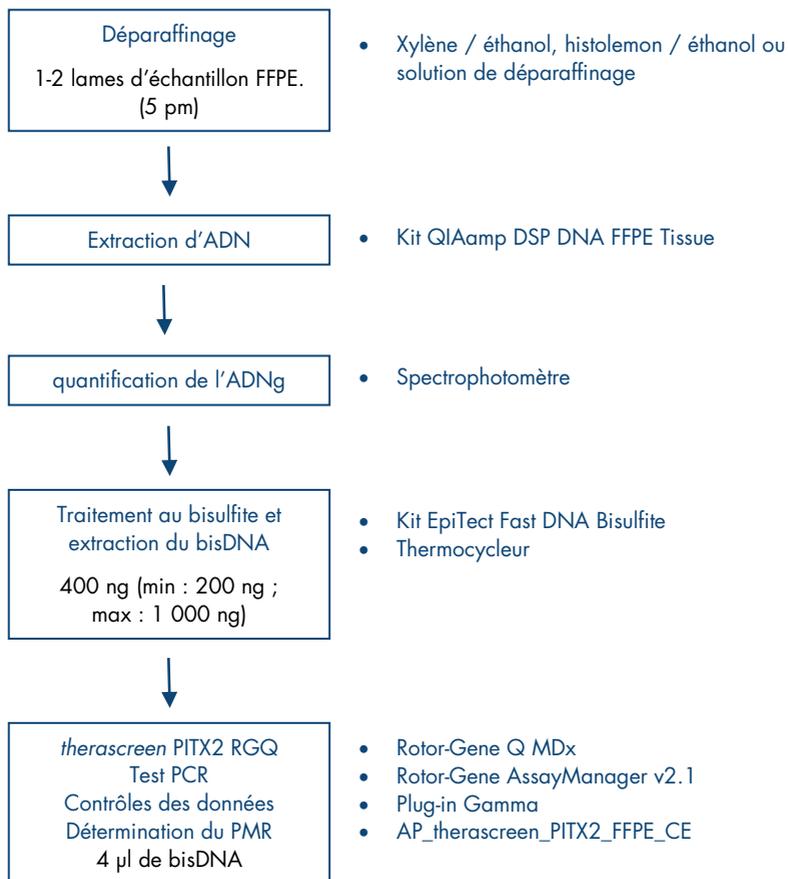


Figure 1. Flux de travail du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR.

L'utilisation du qPCR permet de détecter avec précision une séquence bisDNA ciblée pendant la phase exponentielle du processus d'amplification. Les données du qPCR peuvent être obtenues rapidement, sans traitement post-PCR, grâce à une détection en temps réel de signaux fluorescents pendant le cycle PCR.

Le test du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR utilise le principe de l'hydrolyse d'une oligonucleotide des sondes TaqMan® qPCR en association avec les amorces non spécifiques de la méthylation (Figure 2, page suivante). Ce test utilise une paire d'amorces qui amplifie toutes les séquences cibles traitées au bisulfite. Deux signaux différents sont obtenus à partir de cette amplification en utilisant deux sondes marquées avec des colorants différents. Ces sondes, constituées d'oligonucléotides marqués à l'aide d'un colorant reporter 5' (FAM™ or HEX™) et d'un quencher sans colorant 3' en aval, s'hybrident à une séquence cible à l'intérieur du produit de la PCR. Une sonde est spécifique aux séquences bisDNA obtenues à partir des séquences méthylées colorées avec FAM. L'autre sonde est spécifique aux séquences bisDNA obtenues à partir des séquences non méthylées colorées avec HEX. L'analyse par qPCR TaqMan utilise l'activité exonucléase 5'→ 3' de l'ADN polymérase du *Thermus aquaticus* (*Taq*). Quand la sonde est intacte, la proximité du reporter et du quencher entraîne la suppression de la fluorescence du reporter principalement par transfert d'énergie de type Förster. Durant la PCR, si la cible d'intérêt est présente, les amorces sens et anti-sens se fixent spécifiquement et cernent la sonde hybridée. L'extrémité 3' de la sonde est bloquée afin d'éviter l'extension de la sonde lors de la PCR (Figure 3, page 11). Durant la phase de polymérisation, l'activité exonucléase 5'→ 3' de l'ADN polymérase coupe la sonde, ce qui entraîne la libération du quencher et l'émission du signal de fluorescence du reporter. Les fragments de la sonde sont alors déplacés de la cible, puis la polymérisation du brin se poursuit. Ce processus intervient à chaque cycle et n'interfère pas avec l'accumulation exponentielle du produit (Figure 3, page 11). L'augmentation du signal fluorescent n'est détectée que si la séquence cible est complémentaire des amorces et de la sonde et donc amplifiée durant la PCR. Le cycle de PCR pendant lequel la fluorescence d'une réaction particulière correspond aux valeurs seuils (données par le logiciel *therascreen* PITX2 Assay Package) est défini comme la valeur C_T .

Les résultats du test du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR sont deux valeurs C_T , une pour le FAM et une pour l'HEX. Un PMR est calculé à partir de la valeur ΔC_T entre les deux signaux (Figure 2, page suivante). Le calcul du PMR est effectué à partir de la formule suivante (11) :

$$PMR = \frac{100}{1 + 2^{C_{T,FAM} - C_{T,HEX}}}$$

Le PMR obtenu donnera des informations au médecin traitant afin de savoir si le patient est susceptible de répondre à la chimiothérapie à base d'anthracyclines. Si le PMR obtenu est égal ou inférieur à 12, le patient est susceptible de répondre à la chimiothérapie à base d'anthracyclines. En revanche, si le PMR obtenu est supérieur à 12, un traitement alternatif peut être proposé, puisque le patient a une plus faible probabilité de répondre à la chimiothérapie à base d'anthracyclines.

Le délai d'exécution de toutes les tâches, de l'extraction de l'ADNg à l'analyse de données, est inférieur à deux jours ouvrables.

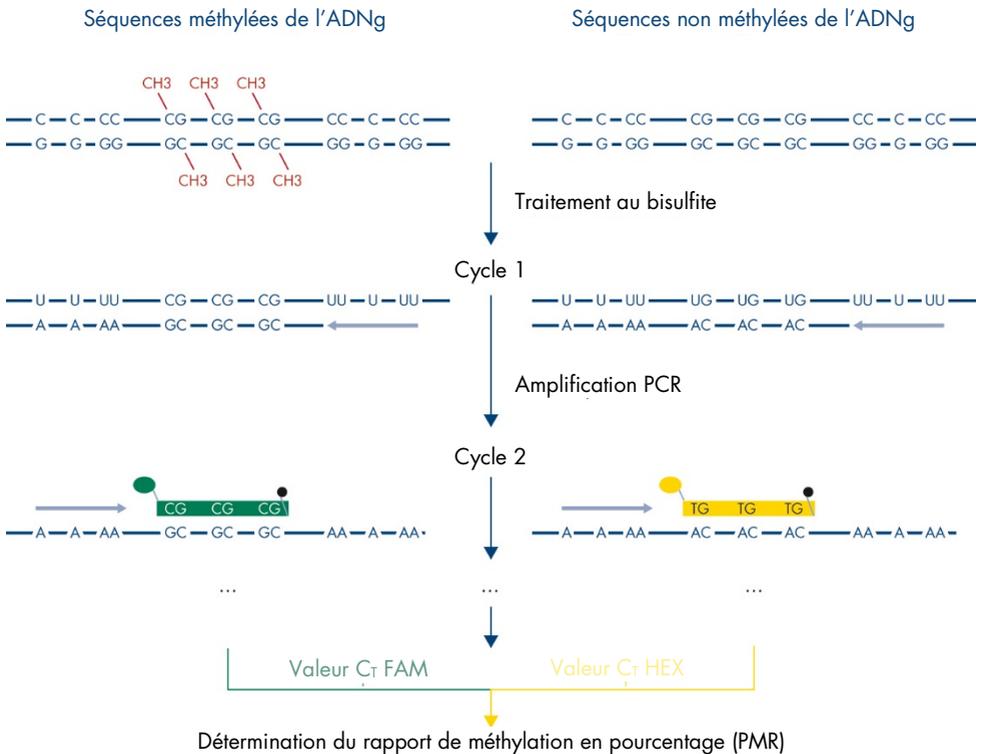


Figure 2. Principe du test du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR.

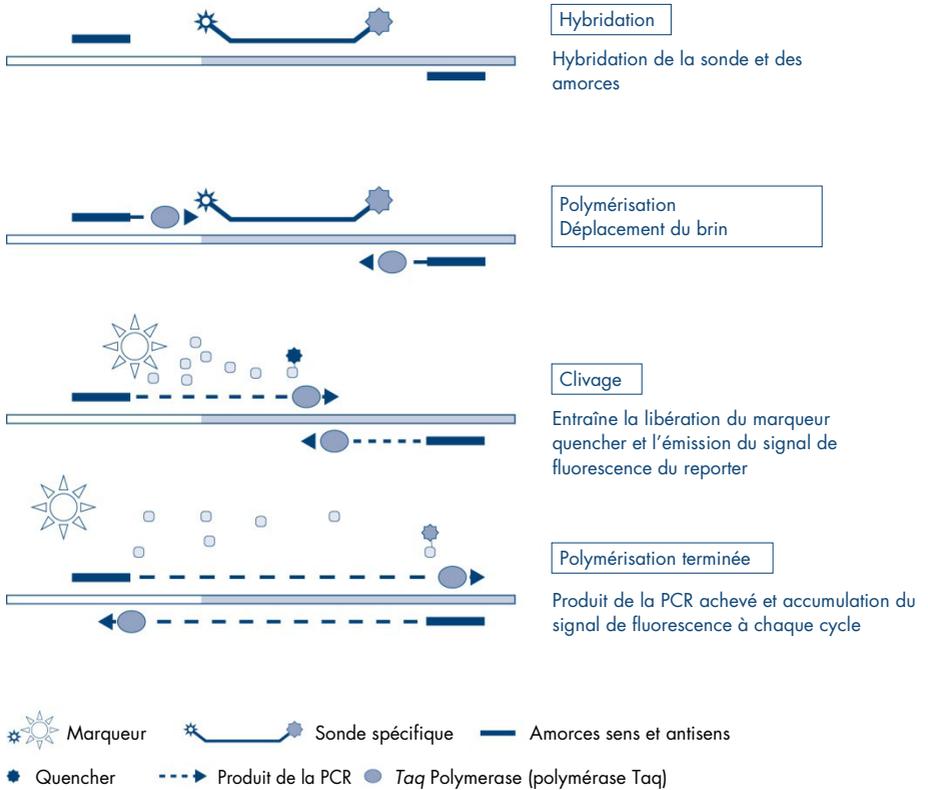


Figure 3. Principe du test PCR en temps réel TaqMan.

Matériel fourni

Contenu du kit

<i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR Kit		(8)
Réf.		873211
Nombre de réactions		8
Violet	PITX2 RGQ PCR Master Mix (PITX2 RGQ PCR mélange principal)	660 µl
Bleu	PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix (PITX2 RGQ PCR mélange de sonde et amorce)	192 µl
Jaune	PITX2 RGQ PCR Reference 50 (PITX2 RGQ PCR référence 50)	12 µl
Orange	PITX2 RGQ PCR Reference Low (PITX2 RGQ PCR référence faible)	12 µl
Vert	PITX2 RGQ PCR Negative Control (PITX2 RGQ PCR contrôle négatif)	12 µl
Incolore	PITX2 RGQ PCR NTC	12 µl
–	Instructions For Use (Handbook)(Instructions d'utilisation (Manuel))	1

Matériel nécessaire, mais non fourni

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) (safety data sheets, SDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

S'assurer que les instruments ont été vérifiés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant. S'assurer que tous les réactifs des kits ne sont pas périmés et qu'ils ont été transportés et conservés dans les bonnes conditions.

Réactifs

- Éthanol (grade moléculaire 96–100 %)

Remarque : ne pas utiliser d'alcool dénaturé, qui contient d'autres substances, telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone.

Équipement

- ThermoMixer, agitateur-incubateur orbital, bloc chauffant ou bain-marie capable d'incuber à 56 °C et 90 °C

Remarque : considérer les critères relatifs à la forme du tube du ThermoMixer pour sélectionner la taille du tube appropriée (p. ex. des tubes de 2 ou 1,5 ml)

- Pipettes réglables* spécialement conçues pour la PCR (1–10 µl ; 10–100 µl ; 100–1 000 µl)
Au moins deux jeux de pipettes sont recommandés, le premier pour la préparation et la distribution des mélanges réactionnels de PCR et le second pour la manipulation du bisADN et des contrôles incluant le chargement de la matrice PCR.
- Embouts de pipettes pour PCR avec filtres hydrophobes exempts de nucléase, résistants aux aérosols et stériles (les embouts de pipettes avec filtre de protection contre les aérosols sont recommandés afin d'éviter toute contamination croisée).
- 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (Microtubes à centrifugation de 1,5 ml ou 2 ml) (tubes de 1,5 ml, disponibles chez Eppendorf, réf. 0030120.086 ou chez Sarstedt, réf. 72.690)
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour tubes de réaction de 0,5 ml, 1,5 ml et 2,0 ml (capable d'atteindre 20 000 tr/min [20 000 × g])

*S'assurer que les instruments ont été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

- Agitateur-mélangeur vortex
- Spectrophotomètre, p. ex., instrument NanoDrop® ou QIAxpert® (Plug-in QIAamp : mesure de l'acide nucléique total)*
- Gants jetables

Réactifs optionnels pour le contrôle du flux de travail

- One vial containing one section (15 or 20 µm) of KRAS G13D Reference Standard (Un flacon contenant une lame (15 ou 20 µm) de l'étalon de référence KRAS G13D) (Horizon Discovery, réf. HD216)

Pour l'extraction manuelle de l'ADN

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (Kit QIAamp® DNA FFPE Tissue) (réf. 60404)
- Deparaffinization Solution (Solution de déparaffinage) (réf. 19093) ou xylène ou histolemon (Carlo Erba, réf. 454911)

Important : la solution de déparaffinage, le xylène et l'histolemon ne sont pas fournis avec le kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue et doivent être commandés séparément.

Suppléments pour le traitement au bisulfite

- EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Kit EpiTect Fast DNA Bisulfite) (réf. 59824 ou 59826)
- Tubes de réaction de 0,2 ml ou barrettes de microtitration à 8 puits
- Microtubes à centrifugation de 0,2 ml
- Thermocycleur avec couvercle chauffant (puisque la réaction au bisulfite n'est pas recouverte d'huile minérale, seuls les thermocycleurs avec des couvercles chauffants conviennent à cette procédure)

* Il s'agit d'une liste incomplète de fournisseurs.

Pour la PCR sur l'instrument Rotor-Gene® Q MDx

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (réf. 9002032) et accessoires fournis
- Logiciel Rotor-Gene AssayManager® version 2.1.x (où x = 0 ou plus)
- Plug-in Gamma version 1.0.x (où x = 0 ou plus) de Rotor-Gene AssayManager v2.1
- Profil du test thetascreen_PITX2_FFPE_CE version 1.0.x (où x = 1 ou plus)
- Loading Block for 72 x 0.1 ml Tubes (bloc de chargement pour tubes de 72 x 0,1 ml) (réf. 9018901)
- 72-Well Rotor (rotor à 72 puits) (réf. 9018903)
- Adaptor Locking Ring 72-Well Rotor (bague de fermeture rotor à 72 puits) (réf. 9018904)
- Rotor Holder (support du rotor) (réf. 9018908)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (tubes en barrettes et capuchons, 0,1 ml) pour l'instrument Rotor-Gene Q MDx (réf. 981103 ou 981106)
- Glace (ou bloc de refroidissement)

Avertissements et précautions

Pour utilisation en diagnostic in vitro

Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, veuillez consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site www.qiagen.com/safety répertoriant les FDS consultables et imprimables pour chaque kit QIAGEN® et pour chaque composant de kit.

Pour des informations de sécurité concernant la solution de déparaffinage, le xylène-éthanol, l'histolemon-éthanol, le kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue ou le kit EpiTect Fast DNA Bisulfite, consulter les manuels correspondants. Pour des informations de sécurité concernant les instruments, consulter le manuel d'utilisation de l'instrument correspondant.

Précautions générales

L'utilisation des tests de qPCR nécessite de bonnes pratiques de laboratoire, incluant la traçabilité, la maintenance de l'équipement spécifique à la biologie moléculaire et le respect des réglementations applicables et des normes pertinentes.

L'utilisation de ce kit est destinée au diagnostic in vitro. Les réactifs et les instructions fournis dans ce kit ont été testés pour obtenir des performances optimales.

- Tous les produits chimiques et biologiques sont potentiellement dangereux. Les prélèvements et échantillons présentent un risque potentiel d'infection et doivent être traités comme du matériel présentant un risque biologique.
- Jeter les échantillons et les tests usagés conformément aux procédures de sécurité locales.
- Les réactifs du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR sont dilués de manière optimale. Ne pas effectuer de dilution supplémentaire des réactifs : celle-ci pourrait entraîner une baisse des performances.
- Ne pas utiliser de volume réactionnel (mélange réactionnel plus échantillon) inférieur ou supérieur à 20 µl.
- Chez QIAGEN, les procédures de contrôle de la qualité utilisent des tests fonctionnels de validation des kits pour chaque lot de kit individuel. Par conséquent, ne pas mélanger les réactifs de lots différents, car cela risquerait d'en affecter les performances.
- Le flux de travail total du *therascreen* PITX2 nécessite le transfert d'échantillons dans des tubes différents, par conséquent, s'assurer que la traçabilité des échantillons est bien respectée pour chaque étape.

- S'assurer que le profil du test PITX2 et le plug-in du Rotor-Gene AssayManager v2.1 requis sont installés.
- Pour de plus amples informations sur les avertissements, précautions et procédures, consulter le manuel d'utilisation du Rotor-Gene Q MDx et le manuel d'utilisation de l'application principale du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1.
- Une modification des temps et des températures d'incubation peut provoquer des données erronées ou discordantes.
- Décongeler tous les composants et échantillons *therascreen* PITX2 RGQ PCR dans un réfrigérateur, sur de la glace, sur un bloc de refroidissement ou à température ambiante aussi longtemps que nécessaire.

Remarque : en cas de décongélation à température ambiante, vérifier régulièrement que le matériau a décongelé, en particulier le PITX2 RGQ PCR Master Mix (MMx) puisqu'il contient des dNTP qui sont sensibles à la température.

Remarque : le PITX2 RGQ PCR PPM doit être conservé à l'abri de la lumière puisqu'il contient des nucléotides colorés.

Remarque : éviter les décongélation et congélation répétées et ne pas dépasser un maximum de quatre cycles de congélation-décongélation.

- Préparer toutes les réactions (mélange réactionnel plus échantillon) sur de la glace ou sur un bloc de refroidissement.
- Ne pas utiliser de composants périmés ou mal conservés.
- Les mélanges réactionnels peuvent être altérés s'ils sont exposés à la lumière.
- Ne pas avaler les réactifs.
- Utiliser des pipettes individuelles spéciales pour préparer les mélanges réactionnels et ajouter les matrices.
- Ne pas ouvrir l'instrument Rotor-Gene Q MDx avant la fin de l'analyse.
- Ne pas ouvrir les tubes Rotor-Gene Q MDx une fois l'analyse terminée. Jeter les tubes conformément aux procédures de sécurité locales.

- Faire preuve de prudence pour garantir un test correct des échantillons. Une attention toute particulière doit être accordée aux mauvaises entrées d'échantillons ainsi qu'aux erreurs de chargement ou de pipetage.
- S'assurer à tout moment de manipuler les échantillons de manière systématique afin d'assurer une identification correcte.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination du mélange de réaction avec les matériaux contenus dans les réactifs de contrôle PITX2 RGQ PCR Reference 50 et PITX2 RGQ PCR Reference Low.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter les contaminations de l'ADN ou des produits de PCR par effet mémoire, qui peuvent générer des signaux faux positifs.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination par la DNase, qui peut provoquer la dégradation de la matrice d'ADN.

Il est par conséquent recommandé :

- d'utiliser des consommables exempts de nucléase (p. ex. pipettes, embouts de pipettes, flacons de réaction) et de porter des gants lors du test ;
- d'utiliser de nouveaux embouts de pipettes résistants aux aérosols à toutes les étapes de pipetage pour éviter les contaminations croisées des échantillons et des réactifs.

Préparer le pré-mélange pour PCR avec du matériel dédié (pipettes, embouts, etc.) dans une zone spéciale où aucune matrice d'ADN (ADN, plasmides ou produits de PCR) n'est introduite. Dans cette même zone, ajouter le PITX2 RGQ PCR NTC au tube approprié (Figure 4, page 39), mais fermer ce tube après avoir chargé tous les autres contrôles et échantillons pour évaluer la contamination croisée. Ajouter les échantillons à tester, le PITX2 RGQ PCR Reference 50, le PITX2 RGQ PCR Reference Low et le PITX2 RGQ PCR Negative Control dans une pièce séparée avec le matériel spécifique (pipettes, embouts, etc.).

Stockage et manipulation des réactifs

Conditions d'expédition

Le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR est expédié sur un lit de glace sèche. Si un des composants du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR n'est pas congelé à l'arrivée, que l'emballage extérieur a été ouvert au cours du transport, que le colis ne contient pas de notice d'emballage ou de réactifs, veuillez contacter les services techniques ou l'un des distributeurs locaux de QIAGEN (visiter le site www.qiagen.com).

Conditions de conservation

Le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR doit être immédiatement stocké dès réception à une température comprise entre -30 °C et -15 °C dans un congélateur à température constante et à l'abri de la lumière.

Pour les informations concernant la conservation et la manipulation de la solution de déparaffinage, du xylène-éthanol, de l'histolemon-éthanol, du kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue ou du kit EpiTect Fast DNA Bisulfite, consulter les manuels des kits correspondants.

Stabilité

Lorsqu'il est stocké dans les conditions de conservation spécifiées, le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR est stable jusqu'à la date de péremption indiquée.

Une fois ouverts, les réactifs peuvent être conservés dans leur emballage d'origine à une température comprise entre -30 et -15 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. Éviter les décongélation et congélation répétées, et ne pas dépasser un maximum de quatre cycles de congélation-décongélation.

Pour les informations concernant la stabilité de la solution de déparaffinage, du xylène-éthanol, de l'histolemon-éthanol, du kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue ou du kit EpiTect Fast DNA Bisulfite, consulter les manuels des kits correspondants.

Il est important de respecter les dates de péremption et les conditions de conservation imprimées sur les boîtes et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants périmés ou mal conservés.

Stockage et manipulation des échantillons

Le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR doit être utilisé avec les échantillons de bisDNA. L'ADN extrait et traité au bisulfite provient de tissu tumoral FFPE prélevé sur des lésions primitives chez des patients atteints du cancer du sein avec un haut risque de ganglions lymphatiques positifs, de récepteurs aux œstrogènes positifs et de HER2-négatif. Fixer les échantillons de tissu dans le formol conformément au protocole du laboratoire (en règle générale, du formol neutre tamponné à 10 %) le plus rapidement possible après l'ablation chirurgicale.

- Le tissu prélevé doit être fixé dans du formol à 4–10% dès que possible après ablation chirurgicale ou biopsie au trocart.
- De préférence, utiliser un temps de fixation de 14–24 heures (des temps de fixation plus longs entraînent une fragmentation de l'ADN importante, qui peut générer des performances basses pour les tests qPCR/qMSP).
- Déshydrater soigneusement les échantillons avant de les enrober (la formaline résiduelle peut inhiber la digestion par la protéinase K).
- Les lames de 5 µm d'épaisseur doivent être découpées à partir du bloc de paraffine.
- Pour les lames ayant une zone tumorale < 100 mm², il est recommandé de traiter deux lames pour augmenter la zone tumorale totale à 100 mm² minimum.
- Marquer, manipuler et conserver les prélèvements tumoraux, blocs, lames et échantillons prêts à l'extraction de manière contrôlée conformément aux procédures locales.

- Transporter et conserver les blocs et lames FFPE à température ambiante. Les lames peuvent être utilisées rapidement pour l'extraction d'ADN.
- L'ADN extrait à l'aide du kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue peut être conservé entre 2 et 8 °C pour une conservation à court terme jusqu'à 24 heures ou entre -30 et -15 °C si une conservation à long terme est nécessaire.
- L'ADN traité au bisulfite à l'aide du kit EpiTect Fast DNA Bisulfite peut être conservé entre -30 et -15 °C pendant au moins 9 mois sans perte au niveau de la qualité ou du traitement. Des recherches complémentaires sur la conservation à long terme sont en cours. Contacter QIAGEN pour plus d'informations.
- La lame de l'étalon de référence KRAS G13D (Horizon Discovery, réf. HD216) pour le contrôle du flux de travail peut être conservée à température ambiante pendant 36 mois à partir de la date de fabrication.

Procédure

Extraction et préparation de l'ADN génomique

Le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR A été validé en association avec la solution de déparaffinage QIAGEN (réf. 19093) pour le déparaffinage de la lame FFPE, le kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (réf. 60404) pour l'extraction de l'ADNg et le kit EpiTect Fast DNA Bisulfite (réf. 59824 ou 59826) pour le traitement au bisulfite du gDNA.

Le déparaffinage de la lame FFPE peut être effectué à l'aide de la solution de déparaffinage, du xylène-éthanol ou de l'histolemon-éthanol (il a été prouvé que ces trois méthodes de déparaffinage sont équivalentes au cours du développement de produits).

Si la solution de déparaffinage (réf. 19093) est utilisée, commencer par la procédure « Déparaffinage de la lame FFPE avec la solution de déparaffinage QIAGEN » à la page 22

Si le mélange xylène-éthanol ou histolemon-éthanol est utilisé, passer directement au « Extraction manuelle de l'ADNg à l'aide du kit » à la page 24

En option : pour déterminer si l'extraction ou le traitement au bisulfite s'est correctement effectué, un contrôle du flux de travail peut être utilisé. Le contrôle du flux de travail qui a été validé pour le flux de travail du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR est la lame de l'étalon de référence KRAS G13D (Horizon Discovery, réf HD216).

S'assurer que les réactifs pour l'extraction de l'ADNg ne sont pas périmés et qu'ils ont été transportés et conservés dans les bonnes conditions. Ne pas utiliser de composants périmés ou mal conservés.

Échantillons de départ

Les échantillons de départ pour l'extraction de l'ADN doivent être des lames de tissu FFPE fraîchement découpées, ils peuvent être conservés jusqu'au lendemain à température ambiante si nécessaire. Deux lames au maximum, chacune ayant une épaisseur de 5 µm et une superficie totale supérieure à 100 mm², doivent être utilisées en tant qu'échantillons de départ pour l'extraction de l'ADNg.

Déparaffinage de la lame FFPE avec la solution de déparaffinage QIAGEN

IMPORTANT : si le déparaffinage est effectué avec un mélange xylène-éthanol ou histolemon-éthanol, passer à « Extraction manuelle de l'ADNg à l'aide du kit » à la page 24.

Remarques importantes avant de commencer

- Effectuer toutes les étapes de centrifugation à température ambiante (15–25 °C).
- Laisser toutes les solutions tampons à température ambiante ; laisser la solution de déparaffinage à 20–25 °C.

- La solution de déparaffinage n'est pas fournie avec le kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue et doit être commandée séparément.

À effectuer avant de commencer

- Préchauffer un ThermoMixer ou un agitateur-incubateur orbital à 56 °C pour les étapes 4 et 8. En l'absence d'un ThermoMixer ou d'un agitateur-incubateur orbital, un bloc chauffant ou un bain-marie peut être utilisé.
- En cas de présence de précipités dans la solution tampon AL ou la solution tampon ATL, les dissoudre à une température de 70 °C sous agitation modérée.
- S'assurer que la solution tampon AW1 et la solution tampon AW2 ont été préparées conformément aux instructions fournies dans le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook (*manual du kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue*).

Procédure (jusqu'à deux lames)

1. À l'aide d'un scalpel, découper la paraffine en excès du bloc d'échantillon. Découper en lames de 5 µm d'épaisseur.

Remarque : si la surface de l'échantillon a été exposée à l'air, mettre au rebut les 2–3 premières coupes.

2. Placer immédiatement la/les section(s) dans un microtube à centrifugation de 1,5 ml ou 2 ml (non fourni).
3. Ajouter 160 µl de solution de déparaffinage et mélanger énergiquement au vortex pendant 10 secondes.
Centrifuger brièvement pour pouvoir prélever le contenu au fond du tube.
4. Incuber à 56 °C pendant 3 minutes, puis laisser refroidir à température ambiante (15–25 °C).
5. Ajouter 180 µl de solution tampon ATL et mélanger au vortex.
6. Centrifuger pendant 1 minute à 11 000 x g (10 000 tr/min). Deux phases apparaissent (une bleue et une transparente).

7. Ajouter 20 µl de protéinase K à la phase inférieure transparente en introduisant la pipette dans la phase supérieure. Mélanger doucement en homogénéisant avec la pipette.
8. Incuber à 56 °C ± 3 °C pendant au moins 1 h (ou jusqu'à lyse complète de l'échantillon).
9. Incuber à 90 °C ± 5 °C pendant 1 heure ± 5 minutes.

L'incubation à 90 °C dans une solution tampon ATL inverse partiellement la modification des acides nucléiques induite par le formaldéhyde. Des temps d'incubation plus longs ou des températures d'incubation plus élevées peuvent générer davantage d'ADN fragmenté.

Remarque : en cas d'utilisation d'un seul bloc chauffant, laisser l'échantillon à température ambiante (15–25 °C) après l'incubation à 56 °C de l'étape 8 jusqu'à ce que le bloc chauffant ait atteint 90 °C dans l'étape 9.

10. Centrifuger brièvement le tube de 1,5 ml afin d'éliminer les gouttes présentes dans le bouchon.
11. Transférer la phase inférieure transparente dans un microtube à centrifugation de 2 ml (non fourni).

Remarque : ne pas transférer de phase bleue.

12. Continuer avec l'étape 14 du « Extraction manuelle de l'ADNg à l'aide du kit » à la page 24.

Extraction manuelle de l'ADNg à l'aide du kit

L'extraction manuelle de l'ADNg est effectuée à l'aide du kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (réf. 60404) conformément au *manuel du kit QIAamp DSP FFPE Tissue*.

Remarques importantes avant de commencer

- Effectuer toutes les étapes de centrifugation à température ambiante (15–25 °C).

À effectuer avant de commencer

- Laisser toutes les solutions tampons s'équilibrer à température ambiante.
- Préchauffer un ThermoMixer ou un agitateur-incubateur orbital à 56 °C pour l'étape 12.
- En l'absence d'un ThermoMixer ou d'un agitateur-incubateur orbital, un bloc chauffant ou un bain-marie peut être utilisé.
- En cas de présence de précipités dans le tampon AL ou le tampon ATL, les dissoudre à une température de 70 °C sous agitation modérée.
- S'assurer que la solution tampon AW1 et la solution tampon AW2 ont été préparées conformément aux instructions fournies dans le manuel du kit *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue*.

Procédure

Remarque : en cas d'utilisation de la solution de déparaffinage QIAGEN, les étapes 1 à 14 doivent être remplacées par la procédure décrite dans « Déparaffinage de la lame FFPE avec la solution de déparaffinage QIAGEN » à la page 22.

1. À l'aide d'un scalpel, découper la paraffine en excès du bloc d'échantillon.
2. Découper 1 à 2 lames de 5 µm d'épaisseur pour atteindre une surface tumorale d'au moins 100 mm² (voir « Échantillons de départ » à la page 22).
Si la surface de l'échantillon a été exposée à l'air, mettre au rebut les 2–3 premières coupes.
3. Placer immédiatement les lames dans un microtube à centrifugation de 1,5 ml ou 2 ml (non fourni).
4. Ajouter à l'échantillon 1 ml de xylène ou d'histolemon. Fermer le capuchon et mélanger énergiquement au vortex pendant au moins 10 secondes.
5. Centrifuger à vitesse maximale pendant environ 2 minutes ±30 secondes à température ambiante.
6. Retirer le surnageant par pipetage. Veiller à ne pas aspirer le culot.

7. Ajouter 1 ml d'éthanol (96 à 100 %) au culot et mélanger le tout par vortexage.
L'éthanol extrait le xylène résiduel de l'échantillon.
8. Centrifuger à vitesse maximale pendant environ 2 minutes \pm 30 secondes à température ambiante.
9. Retirer le surnageant par pipetage. Veiller à ne pas aspirer le culot.
Aspirer avec précaution tout l'éthanol résiduel à l'aide d'un cône de pipette fin.
10. Ouvrir le tube et incuber entre 15 et 40 °C pendant 10 minutes \pm 1 minute ou jusqu'à ce que tout l'éthanol résiduel soit évaporé.
11. Mettre en suspension le culot dans 180 μ l de tampon ATL. Ajouter 20 μ l de protéinase K et mélanger au vortex.
12. Incuber à 56 °C \pm 3 °C pendant au moins 1 h (ou jusqu'à lyse complète de l'échantillon).
13. Incuber à 90 °C \pm 5 °C pendant 1 heure \pm 5 minutes.

L'incubation à 90 °C dans une solution tampon ATL inverse partiellement la modification des acides nucléiques induite par le formaldéhyde. Des temps d'incubation plus longs ou des températures d'incubation plus élevées peuvent générer davantage d'ADN fragmenté. En cas d'utilisation d'un seul bloc chauffant, laisser l'échantillon à température ambiante après l'incubation à 56 °C jusqu'à ce que le bloc chauffant ait atteint 90 °C.

14. Centrifuger brièvement le tube afin d'éliminer les gouttes présentes dans le bouchon.

Remarque : en cas d'utilisation de la solution de déparaffinage, passer à l'étape 15.

15. Ajouter 200 μ l de solution tampon AL et mélanger soigneusement au vortex. Ensuite, ajouter 200 μ l d'éthanol (96 à 100 %) et mélanger à nouveau soigneusement au vortex.

Il est essentiel de mélanger immédiatement et soigneusement l'échantillon, la solution tampon AL et l'éthanol à l'aide d'un agitateur vortex ou par pipetage pour obtenir une solution homogène. La solution tampon AL et l'éthanol peuvent être mélangés au préalable et ajoutés ensemble en une seule étape pour gagner du temps lorsque plusieurs échantillons sont traités en même temps. Un précipité blanc peut se former lors de l'ajout de solution tampon AL et de l'éthanol. Ce précipité n'interfère pas avec la procédure QIAamp.

16. Centrifuger brièvement le tube afin d'éliminer les gouttes présentes dans le bouchon.
17. Transférer avec précaution la totalité du lysat vers la colonne QIAamp MinElute® (dans un tube de prélèvement de 2 ml) sans mouiller le bord, fermer le capuchon et centrifuger à environ 6 000 x g pendant au moins 1 minute. Placer la colonne QIAamp MinElute dans un tube de prélèvement propre de 2 ml (fourni) et éliminer le tube de prélèvement contenant l'effluent.

Si la totalité du lysat n'a pas traversé la membrane après centrifugation, centrifuger à nouveau à vitesse plus élevée jusqu'à ce que la colonne QIAamp MinElute soit vide.
18. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp MinElute et ajouter 500 µl de solution tampon AW1 sans mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger à environ 6 000 x g pendant au moins 1 minute. Placer la colonne QIAamp MinElute dans un tube de prélèvement propre de 2 ml (fourni) et éliminer le tube de prélèvement contenant l'effluent.
19. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp MinElute et ajouter 500 µl de solution tampon AW2 sans mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger à environ 6 000 x g pendant au moins 1 minute. Placer la colonne QIAamp MinElute dans un tube de prélèvement propre de 2 ml (fourni) et éliminer le tube de prélèvement contenant l'effluent. Tout contact entre la colonne QIAamp MinElute et l'effluent doit être évité. Certains rotors de centrifugeuse peuvent vibrer lors de la décélération, ce qui entraîne un contact entre l'effluent, qui contient l'éthanol, et la colonne QIAamp MinElute. Veiller également à retirer prudemment la colonne QIAamp MinElute et le tube de lavage du rotor pour éviter tout contact entre l'effluent et la colonne QIAamp MinElute.
20. Centrifuger à vitesse maximale (environ 20 000 x g) pendant au moins 3 minutes afin de sécher entièrement la membrane.

Cette étape est nécessaire, puisque le transfert d'éthanol dans l'éluat peut inhiber les réactions qPCR effectuées.
21. Placer la colonne QIAamp MinElute dans un microtube à centrifugation propre de 1,5 ml (fourni) et éliminer le tube de prélèvement contenant l'effluent. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp MinElute et ajouter 50 µl de solution tampon ATE au centre de la membrane.

22. Fermer le capuchon et incuber à température ambiante (15–25 °C) pendant 5 minutes.
Centrifuger à vitesse maximale (environ 20 000 x g) pendant au moins 1 minute.

Quantification de l'ADN

Les solutions tampons ATE d'éluion des kits d'extraction de l'ADNg contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. L'azide de sodium absorbe à 260 nm, par conséquent une mesure de blanc avec la solution tampon ATE doit être effectuée pour étalonner le spectrophotomètre.

La concentration en ADN est déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm en suivant la procédure de l'instrument à l'aide de QIAGEN's QIAxpert par exemple (plug-in QIAamp : mesure de l'acide nucléique total) ou d'un instrument NanoDrop*. Les lectures d'absorbance à 260 nm doivent être comprises entre 0,1 et 1,0 pour être précises. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration de 50 µg d'ADN par ml ($A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$).
Quantité totale d'ADN purifié (ng) = concentration d'ADN (ng/µl) x volume d'échantillon (µl).

Remarque : en cas d'utilisation du plug-in QIAamp, un spectre du blanc de l'ATE interne est automatiquement soustrait des valeurs d'absorbance, par conséquent, aucun blanc d'échantillon d'ATE supplémentaire n'est nécessaire dans cette configuration.

De préférence, la concentration minimale d'ADNg doit être de 10 ng/µl[†], mais des échantillons avec une concentration aussi basse que 5 ng/µl peuvent être traités avec un risque de résultats non valides dus à leur « Low Input » (Faible Quantité).

* Il s'agit d'une liste incomplète des spectrophotomètres permettant de mesurer l'absorbance à 260 nm.

† 10 ng/µl permet d'obtenir 400 ng d'ADNg (quantité recommandée) pour le traitement au bisulfite puisque le volume maximum d'ADNg pour le traitement est de 40 µl.

Traitement au bisulfite de l'ADNg à l'aide du kit EpiTect Fast DNA Bisulfite

Ce protocole permet le traitement au bisulfite de 200, 400 et jusqu'à 1 000 ng d'ADN (mesuré en utilisant l'absorbance à 260 nm) avec un volume pouvant atteindre 40 µl. La quantité d'ADN recommandée par réaction pour le traitement au bisulfite est de 400 ng. Cependant, dans le cas d'un faible rendement d'ADN, des quantités d'ADN aussi basses que 200 ng peuvent être utilisées et dans le cas d'une réanalyse à cause d'un indicateur « Faible Quantité » lors de l'analyse qPCR (voir « Indicateurs », page 61), une quantité de ou proche de 1 000 ng doit être utilisée.

Remarque : la quantité de gDNA fait référence à la quantification d'ADNg par mesure de l'absorbance à 260 nm (p. ex., à l'aide de NanoDrop ou de QIAxpert avec le plug-in QIAamp pour la mesure d'acide nucléique total).

Échantillons de départ

- L'ADN génomique doit être utilisé pour le traitement au bisulfite sans étape de digestion par restriction préalable.

Remarques importantes avant de commencer

- S'assurer que les réactifs pour le traitement au bisulfite ne sont pas périmés et qu'ils ont été transportés et conservés dans les bonnes conditions. Ne pas utiliser de composants périmés ou mal conservés.
- DNA Protect Buffer doit passer du vert au bleu après l'ajout du mélange de la solution ADN-Bisulfite, indiquant un mélange suffisant et un pH correct pour la réaction de traitement au bisulfite, un pH incorrect pourrait avoir un impact sur la fixation de l'ADN traité sur la colonne.
- Effectuer toutes les étapes de centrifugation à température ambiante (15–25 °C).

- La solution de bisulfite peut être conservée à température ambiante (15–25 °C) pendant au moins 6 mois.
- Il est possible que des précipités blancs se forment dans le mélange solution tampon BD-éthanol après un certain temps de stockage. Ces précipités n'affecteront pas les performances de la solution tampon BD. Cependant, éviter de transférer les précipités dans la colonne de centrifugation MinElute DNA.

À effectuer avant de commencer

- Préparer les réactifs du kit comme stipulé dans la section « Préparation des réactifs » du *manuel de traitement au bisulfite EpiTect Fast*.
- Laisser les échantillons et les solutions tampons se stabiliser à température ambiante.
- **En option** : chauffer un ThermoMixer, un bloc chauffant ou un agitateur-incubateur orbital à 60 °C afin de dissoudre la solution de bisulfite.

Manipulation des colonnes de centrifugation MinElute DNA

En raison de la sensibilité des technologies d'amplification des acides nucléiques, il est nécessaire de prendre les précautions suivantes lors de la manipulation des colonnes de centrifugation MinElute DNA afin d'éviter toute contamination croisée entre les échantillons :

- déposer avec précaution l'échantillon ou la solution à la pipette sur la colonne centrifuge MinElute DNA sans en mouiller le bord. Éviter de toucher la membrane de la colonne MinElute DNA avec l'embout de la pipette ;
- toujours changer les embouts des pipettes entre chaque transfert de liquide. Il est recommandé d'utiliser des embouts à filtre de protection contre les aérosols ;
- ouvrir une seule colonne de centrifugation MinElute DNA à la fois et prendre garde à ne pas générer d'aérosols ;
- porter des gants pendant toute la procédure. En cas de contact des gants avec l'échantillon, les changer immédiatement.

Centrifugation

- Les colonnes de centrifugation MinElute DNA sont compatibles avec la plupart des microtubes à centrifugation standard de 1,5 ml–2 ml. Un ensemble de tubes de prélèvement de 2 ml est fourni pour l'étape de centrifugation à sec.
- Toutes les étapes de centrifugation doivent être effectuées à température ambiante (15–25 °C).
- Placer les colonnes de centrifugation MinElute DNA dans une microcentrifugeuse.
- Toujours fermer les colonnes de centrifugation MinElute DNA avant de les installer dans la microcentrifugeuse.
- Pour un traitement efficace de plusieurs échantillons en parallèle, nous recommandons de remplir un portoir avec des tubes de prélèvement dans lesquels les colonnes MinElute DNA peuvent être transférées après centrifugation. Les tubes de prélèvement peuvent être utilisés plusieurs fois.

Procédure

1. Décongeler l'ADN qui doit être utilisé pour les réactions de traitement au bisulfite. S'assurer que la solution de bisulfite est complètement dissoute.

Remarque : si nécessaire, chauffer la solution de bisulfite à 60 °C et mélanger au vortex jusqu'à ce que les précipités soient à nouveau dissous.

Remarque : ne pas placer la solution de bisulfite dissoute sur de la glace.

2. Préparer les réactions au bisulfite dans des tubes PCR de 200 µl (non fournis) selon le Tableau 1 à la page suivante. Ajouter chaque composant dans l'ordre indiqué.

Remarque : le volume combiné d'ADN et d'eau exempte d'ARNase doit être de 40 µl au total.

Remarque : pour déterminer le volume approprié pour la quantité d'ADNg d'intérêt, utiliser la formule suivante :

$$\text{Volume d'ADNg requis pour un traitement au bisulfite } (\mu\text{l}) = \frac{\text{Quantité d'intérêt (ng)}}{\text{Concentration moyenne en ADNg (ng}/\mu\text{l)}}$$

Remarque : en cas d'utilisation du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR, le protocole « Faible concentration » du EpiTect Fast Bisulfite Conversion Handbook (*manuel de traitement au bisulfite EpiTect Fast*) doit toujours être utilisé, même avec une quantité de 1 000 ng, puisque la concentration d'ADNg extrait des échantillons FFPE est généralement faible.

Remarque : le mélange de bisulfite doit immédiatement être mélangé au vortex pendant 5 secondes après l'ajout du DNA Protect Buffer pour empêcher la dégradation des échantillons.

Tableau 1. Composants pour la réaction au bisulfite

Composant	Volume par réaction (µl)
ADN	Variable* (40 µl maximum)
Eau exempte de RNase	Variable*
Solution de bisulfite	85
DNA Protect Buffer	15
Volume total	140

* Le volume combiné d'ADN et d'eau exempte d'ARNase doit être de 40 µl au total.

3. Fermer les tubes PCR immédiatement et mélanger soigneusement les réactions de bisulfite. Conserver les tubes à température ambiante (15–25 °C).

Remarque : DNA Protect Buffer doit passer du vert au bleu après l'ajout du mélange de la solution ADN-Bisulfite, indiquant un mélange suffisant et un pH correct pour la réaction de traitement au bisulfite, ou la fixation d'ADN sur la colonne de centrifugation MinElute DNA.

4. Effectuer le traitement de l'ADN au bisulfite à l'aide d'un thermocycleur. Programme le thermocycleur selon le Tableau 2 à la page suivante.

Un cycle complet dure approximativement 30 minutes.

Remarque : en cas d'utilisation d'un thermocycleur qui ne permet pas d'entrer le volume réactionnel (140 µl), programmer l'instrument avec le plus grand volume disponible.

Tableau 2. Conditions du thermocycleur pour le traitement au bisulfite

Étape	Durée	Température
Dénaturation	5 min	95 °C
Incubation	10 min	60 °C
Dénaturation	5 min	95 °C
Incubation	10 min	60 °C
Plateau	Indéfinie	20 °C

* L'ADN traité peut être laissé dans le thermocycleur jusqu'au lendemain sans aucune perte de performance.

- Placer les tubes PCR contenant les réactions au bisulfite dans le thermocycleur. Démarrer le programme de thermocyclage Incubation.

IMPORTANT : puisque la réaction au bisulfite n'est pas recouverte d'huile minérale, seuls les thermocycleurs avec des couvercles chauffants conviennent à cette procédure. Il est important d'utiliser des tubes PCR qui se ferment hermétiquement.

Remarque : l'ADN traité peut être laissé dans le thermocycleur jusqu'au lendemain sans aucune perte de performance.

Nettoyage de l'ADN traité au bisulfite

- Une fois que le traitement au bisulfite est terminé, centrifuger brièvement les tubes PCR contenant les réactions au bisulfite, puis transférer les réactions au bisulfite terminées dans des microtubes à centrifugation de 1,5 ml.

Le transfert des précipités dans la solution n'affectera pas les performances et le rendement de la réaction.

- Ajouter 310 µl de solution tampon BL à chaque échantillon. Mélanger la solution au vortex puis la centrifuger brièvement.

8. Ajouter 250 µl d'éthanol (96-100 %) à chaque échantillon. Mélanger les solutions à l'aide du vortex en mode Pulse pendant 15 secondes, et centrifuger brièvement afin d'éliminer les gouttes présentes dans le bouchon.
9. Placer le nombre nécessaire de colonnes de centrifugation MinElute DNA et les tubes de prélèvement dans un portoir adapté. Transférer la totalité du mélange de chaque tube de l'étape 8 dans la colonne de centrifugation MinElute DNA correspondante.
10. Centrifuger les colonnes de centrifugation à vitesse maximale pendant 1 minute. Jeter l'effluent et replacer les colonnes de centrifugation dans les tubes de prélèvement.
11. Ajouter 500 µl de solution tampon BW (solution tampon de lavage) à chaque colonne de centrifugation, et centrifuger à vitesse maximale pendant 1 minute. Jeter l'effluent et replacer les colonnes de centrifugation dans les tubes de prélèvement.
12. Ajouter 500 µl de solution tampon BD (solution tampon de désulfonation) à chaque colonne de centrifugation, incubé pendant 15 minutes à température ambiante (15–25 °C).
En cas de précipités dans la solution tampon BD, éviter de les transférer dans les colonnes de centrifugation.
IMPORTANT : la bouteille contenant la solution tampon BD doit être immédiatement fermée après utilisation afin d'éviter toute acidification due au dioxyde de carbone présent dans l'air.
Remarque : il est important de fermer les couvercles des colonnes de centrifugation avant incubation.
13. Centrifuger les colonnes de centrifugation à vitesse maximale pendant 1 minute. Jeter l'effluent et replacer les colonnes de centrifugation dans les tubes de prélèvement.
14. Ajouter 500 µl de solution tampon BW à chaque colonne de centrifugation et centrifuger à vitesse maximale pendant 1 minute. Jeter l'effluent et replacer les colonnes de centrifugation dans les tubes de prélèvement.
15. Répéter l'étape 14 encore une fois.
16. Ajouter 250 µl d'éthanol (96-100 %) à chaque colonne de centrifugation à vitesse maximale pendant 1 minute.

-
17. Placer les colonnes de centrifugation dans de nouveaux tubes de prélèvement de 2 ml (fournis) et centrifuger les colonnes de centrifugation à vitesse maximale pendant 1 minute pour retirer tout liquide résiduel.
18. Placer les colonnes de centrifugation avec les couvercles ouverts dans un microtube à centrifugation de 1,5 ml (non fourni) et incuber les colonnes pendant 5 minutes à 60 °C dans un bloc chauffant. Cette étape permet de vérifier l'évaporation de tout liquide résiduel.
19. Ajouter 15 µl de solution tampon EB (solution tampon d'éluat) directement au centre de la membrane de chaque colonne de centrifugation et fermer doucement les couvercles.
- Remarque** : ne pas éluer avec moins de 15 µl de solution tampon, car le volume d'éluat serait trop petit pour passer à l'étape qPCR.
20. Incuber les colonnes de centrifugation à température ambiante pendant 1 minute.
21. Centrifuger pendant 1 minute à 15 000 x g (12 000 tr/min) afin d'éluer l'ADN.
- Remarque** : nous recommandons de conserver l'ADN extrait à 2–8 °C jusqu'à 24 heures. Si l'ADN extrait doit être conservé pendant plus de 24 heures, nous recommandons de le stocker à une température comprise entre -30 et -15 °C.

Protocole : qPCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR doit être traité sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* en utilisant l'interprétation automatisée des résultats à l'aide du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Prendre le temps de se familiariser avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx et avec le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 avant de commencer le protocole. Consulter les manuels d'utilisation de l'instrument, de Rotor-Gene AssayManager v2.1 et du plug-in Gamma pour plus d'informations.

Remarque importante : en cas d'utilisation du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1, du plug-in Gamma et du profil de test pour la première fois, consulter la section « Installation du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 et du plug-in Gamma et importation du profil de test » à la page 52 pour les instructions d'installation. Si le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1, le plug-in Gamma et le profil de test sont déjà installés et importés dans votre ordinateur, suivez les instructions ci-dessous :

Configuration de la qPCR

Le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR contient des produits permettant de tester huit échantillons pour trois analyses au maximum.

* Le cas échéant, utiliser un appareil Rotor-Gene Q 5plex HRM avec une date de production de janvier 2010 ou ultérieure. La date de production peut être obtenue à partir du numéro de série à l'arrière de l'instrument. Le numéro de série présente le format « mmaannn », où « mm » désigne le mois de production en chiffres, « aa » les deux derniers chiffres de l'année de production et « nnn » l'identifiant d'instrument unique.

À effectuer avant de commencer

- Refroidir un bloc de chargement pour 72 x tubes de 0,1 ml pendant 10 minutes dans un congélateur ou pendant au moins 1 heure à la température d'un réfrigérateur.
- Décongeler tous les composants et échantillons du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR dans un réfrigérateur, sur de la glace, sur un bloc refroidissant ou à température ambiante aussi longtemps que nécessaire.

Remarque : si décongelé à température ambiante, vérifier régulièrement que le matériel est bien décongelé, en particulier le PITX2 RGQ PCR MMx puisqu'il contient des dNTP qui sont sensibles à la température.

Remarque : le PITX2 RGQ PCR PPM doit être conservé à l'abri des rayons du soleil puisqu'il contient des nucléotides colorés.

- Placer les produits décongelés sur de la glace, sur un bloc refroidissant ou dans un réfrigérateur jusqu'à les remettre après utilisation entre -30 et -15 °C.

Remarque : les composants du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR peuvent être conservés entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière pendant 6 heures au maximum s'ils sont utilisés plusieurs fois au cours de la même journée.

Remarque : les composants du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR peuvent être utilisés avec un maximum de quatre cycles de congélation-décongélation.

- Nettoyer la zone de la paillasse dédiée à la préparation du mélange pour PCR afin de réduire le risque de contamination de matrice ou de nucléase.
- Mélanger les tubes au vortex (10-12 secondes) et les centrifuger brièvement avant utilisation. Séparer le PITX2 RGQ PCR MMx qui est mélangé en homogénéisant avec la pipette puisqu'il contient la polymérase *Taq*.

Procédure

1. Préparer le mélange de réaction PITX2 qPCR **sur de la glace** (ou en utilisant un bloc refroidissant) dans un tube de 1,5 ou 2 ml (non fourni) en fonction du nombre d'échantillons à traiter.

Le schéma de pipetage pour la préparation du mélange de réaction PITX2, indiqué dans Tableau 3 (page suivante), est calculé pour obtenir des volumes de réaction finaux de 20 µl après ajout de 4 µl de bisDNA ou de contrôle. Un volume supplémentaire est inclus afin de compenser toute erreur de pipetage et permettre la préparation de suffisamment de mélange de réaction pour 4 échantillons testés en double plus 4 contrôles. Si moins d'échantillons sont testés, le mélange réactionnel peut être préparé en conséquence. Veiller à laisser un volume supplémentaire pour compenser les erreurs de pipetage (un puits supplémentaire jusqu'à 10 puits et deux puits supplémentaires jusqu'à 20 puits).

Tableau 3. Préparation du mélange réactionnel *therascreen* PITX2 RGQ PCR

Composant	1 réaction (µl)	Exemple pour une plaque à 12 puits : 12+2 extra réactions (µl)*
PITX2 RGQ PCR Master Mix	10	140
PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix	6	84
Volume total de mélange réactionnel pour qPCR (µl)	16	224
Distribution du mélange réactionnel pour qPCR	16 µl par tube	
Distribution des échantillons	4 µl par tube	
Volume total de réaction qPCR	20 µl	

* Un volume réactionnel supplémentaire est inclus pour compenser les erreurs de pipetage : un puits supplémentaire jusqu'à 10 puits et deux puits supplémentaires jusqu'à 20 puits.

2. Mélanger au vortex (10-12 secondes) et centrifuger brièvement le mélange réactionnel PITX2 qPCR. Placer les tubes en barrettes de qPCR sur un bloc de chargement de 72 refroidi au préalable et verser 16 µl du mélange réactionnel PITX2 qPCR par tube en barrette en suivant l'exemple de configuration du bloc de chargement indiqué sur la Figure 4.

Remarque : il est recommandé de verser les 16 µl du mélange réactionnel par pipetage inverse.

1	REF50	9	Sample 3	17	NA	25	NA	33	NA	41	NA	49	NA	57	NA	65	NA
2	REFlow	10	Sample 3	18	NA	26	NA	34	NA	42	NA	50	NA	58	NA	66	NA
3	NC	11	Sample 4	19	NA	27	NA	35	NA	43	NA	51	NA	59	NA	67	NA
4	NTC	12	Sample 4	20	NA	28	NA	36	NA	44	NA	52	NA	60	NA	68	NA
5	Sample 1	13	NA	21	NA	29	NA	37	NA	45	NA	53	NA	61	NA	69	NA
6	Sample 1	14	NA	22	NA	30	NA	38	NA	46	NA	54	NA	62	NA	70	NA
7	Sample 2	15	NA	23	NA	31	NA	39	NA	47	NA	55	NA	63	NA	71	NA
8	Sample 2	16	NA	24	NA	32	NA	40	NA	48	NA	56	NA	64	NA	72	NA

Figure 4. Configuration du bloc de chargement pour une expérience avec le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR pour tester quatre échantillons. Les chiffres indiquent les positions dans le bloc de chargement et la position finale dans le rotor. Les positions des contrôles sont configurées dans le profil du test PITX2 et ne peuvent pas être modifiées. Si les contrôles ne sont pas placés comme indiqué, l'analyse du résultat automatisé ne peut pas être effectuée. **REF50** : PITX2 RGQ PCR Reference 50 ; **REFlow** : PITX2 RGQ PCR Reference Low ; **NC** : PITX2 RGQ PCR Negative Control, **NTC** : PITX2 RGQ PCR NTC (NTC) ; **Échantillon 1 à 4** : échantillons bisDNA, **NA** : Puits vide.

- Mélanger au vortex (10-12 secondes) et centrifuger brièvement les échantillons de bisDNA, le PITX2 RGQ PCR Reference 50 (Ref50), le PITX2 RGQ PCR Reference Low (RefLow), le PITX2 RGQ PCR Negative Control (NC) et le PITX2 RGQ PCR NTC (NTC).
- Ajouter 4 µl d'échantillon ou de matériel de contrôle dans le tube correspondant conformément à la configuration sur la Figure 4 afin d'obtenir un volume total de 20 µl. Mélanger doucement 5 fois en homogénéisant avec la pipette.

Remarque : veiller à changer d'embout entre chaque tube afin d'éviter toute contamination avec une matrice non spécifique, ce qui entraînerait des résultats faux positifs.

- Fermer tous les tubes et vérifier l'absence de bulles au fond des tubes.
- Remettre tous les composants du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR dans des conditions de conservation appropriées afin d'éviter toute dégradation des matériels.

Préparation du Rotor-Gene MDx

Il est fortement recommandé de lancer une analyse dès que possible après la préparation. Cependant, si la plaque est préparée mais ne peut pas être analysée directement (car l'instrument est indisponible), il est possible de conserver la plaque entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière jusqu'à 24 heures (voir « Durée d'utilisation » à la page 78).

7. Placer un rotor à 72 puits sur le support de rotor Rotor-Gene Q MDx.
8. Remplir le rotor de tubes en barrettes préparés au préalable conformément aux positions attribuées, commençant à la position 1, comme indiqué sur la Figure 5.
9. Compléter les positions vides avec des tubes vides et fermés afin de remplir totalement le rotor.

Remarque : veiller à ce que le premier tube soit inséré en position 1 et que l'orientation et les positions des barrettes de tubes soient correctes (critères importants pour la validité de l'analyse et la traçabilité de l'échantillon), comme indiqué sur la Figure 5.

Remarque : toujours garder les quatre contrôles (REF50, REFlow, NC et NTC) dans les positions 1 à 4 pour que l'optimisation de l'augmentation (effectuée sur le tube en position 1) soit toujours réalisée avec la même amplification. Veiller à ce que les contrôles soient dans le bon ordre pour l'analyse automatisée des contrôles (une inversion des contrôles invalidera l'analyse par le profil du test PITX2).

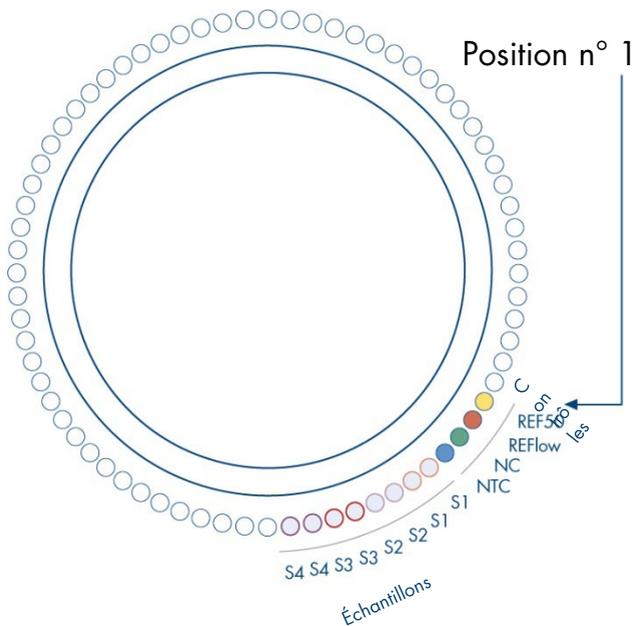


Figure 5. Configuration du rotor pour une expérience avec le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR. REF50 : PITX2 RGQ PCR Reference 50 ; REFlow : PITX2 RGQ PCR Reference Low ; NC : PITX2 RGQ PCR Negative Control, NTC : PITX2 RGQ PCR NTC (NTC) ; S1 à S4 : échantillons bisDNA. **Remarque** : toutes les positions restantes  devraient être remplies par des tubes vides.

10. Fixer la bague de fermeture.

11. Charger le rotor avec la bague de fermeture sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx. Fermer le couvercle de l'instrument.

Créer une liste de tâches et commencer une analyse qPCR

Remarque : la liste de tâches peut être créée et enregistrée avant de préparer les échantillons ou lorsque l'expérience est configurée sur l'instrument, comme stipulé dans ce manuel.

12. Allumer l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

13. Ouvrir le logiciel Rotor-Gene AssayManager en cliquant sur l'icône :  . La fenêtre du logiciel Rotor-Gene AssayManager s'ouvre (Figure 6).



Figure 6. Écran de connexion au logiciel Rotor-Gene AssayManager.

14. Se connecter en tant qu'utilisateur avec le rôle « Operator » dans le mode fermé. Cliquer sur « OK ». L'écran du logiciel Rotor-Gene AssayManager s'ouvre (Figure 7, page suivante).

15. Vérifier que le RGQ est correctement détecté au logiciel avant de lancer l'analyse.

16. Sélectionner l'onglet « Setup » (Paramètres).

Remarque : les fonctionnalités générales de l'environnement Configuration et de « Création / modification d'une liste de tâches » sont décrites dans le manuel d'utilisation de l'application principale du logiciel *Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

17. Cliquer sur « Nouvelle liste de tâches » (Figure 7).

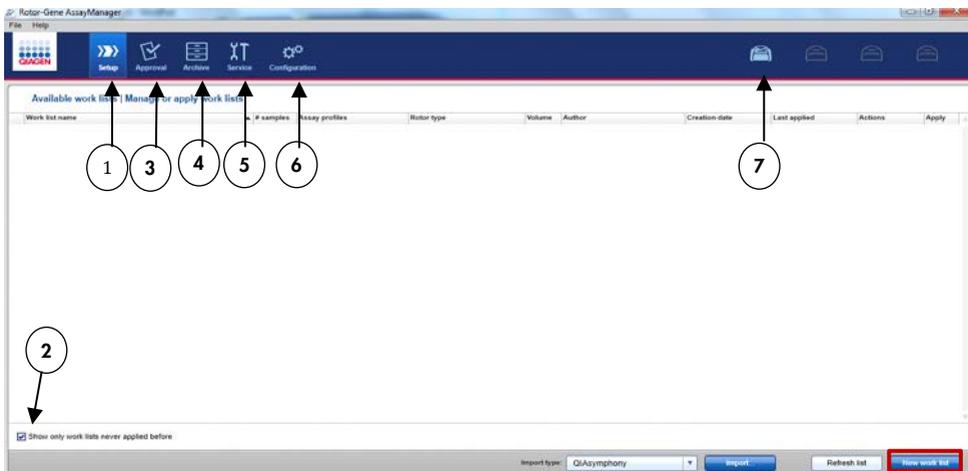


Figure 7. Description des différents onglets présents dans le logiciel RGAM.

- | | |
|--|--|
| <p>1 Onglet Setup. Cet onglet permet de gérer et d'ajouter des listes de tâches.</p> <p>2 Check available work lists. (Vérifier les listes de tâches disponibles.) Indique seulement les nouvelles listes de tâches. Une « liste de tâches appliquée » a déjà été effectuée.</p> <p>3 Onglet Approval (Approbation). Cet onglet permet de trouver les expériences précédentes.</p> <p>4 Onglet Archive. Permet de trouver d'anciennes expériences qui ont déjà été approuvées.</p> | <p>5 Onglet Service. Indique un rapport d'une piste d'audit pour chaque fichier généré par le logiciel.</p> <p>6 Onglet Configuration. Permet de configurer tous les paramètres du logiciel</p> <p>7 Icônes Rotor-Gene Q MDx (RGQ) :</p> <p> Non connecté  Connecté</p> |
|--|--|

18. Sélectionner le profil du test PITX2 dans la liste des profils de test disponibles (Figure 8).

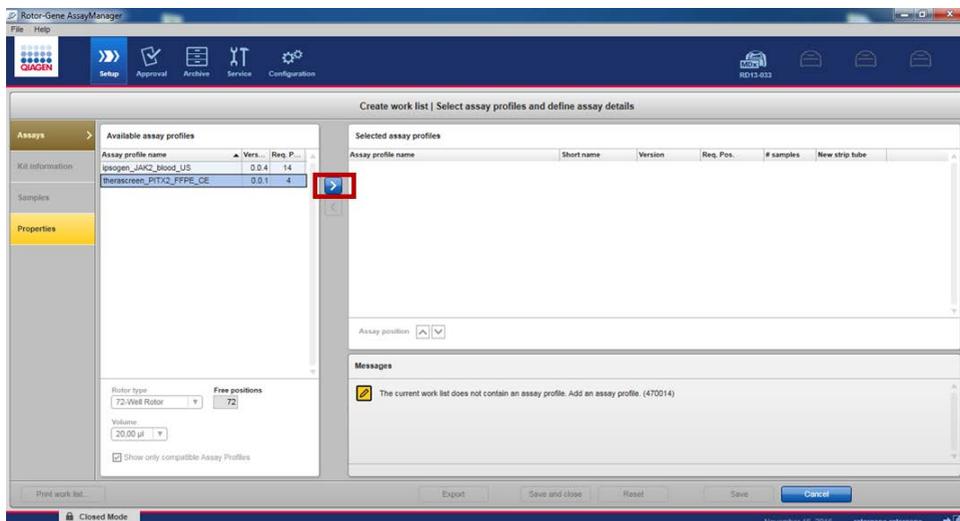


Figure 8. Importation du profil de test.

19. Transférer le profil de test sélectionné vers la liste des profils de test sélectionnés en cliquant sur la flèche (à droite du nom du profil de test). Le profil de test doit maintenant s'afficher dans la liste de profils de test sélectionnés (Figure 8).

20. Dans l'onglet « Tests », compléter les champs en jaune : Nombre d'échantillons (jusqu'à 8) en fonction de la configuration de votre plaque (Figure 9).

Remarque : le nombre d'échantillons ne correspond pas au nombre de puits et n'inclut pas les contrôles. Les échantillons sont testés en double ; par conséquent, un échantillon correspond à deux puits. Par exemple, le nombre d'échantillons à insérer est 4 pour la plaque de 12 puits présentée sur la Figure 4 (page 39).

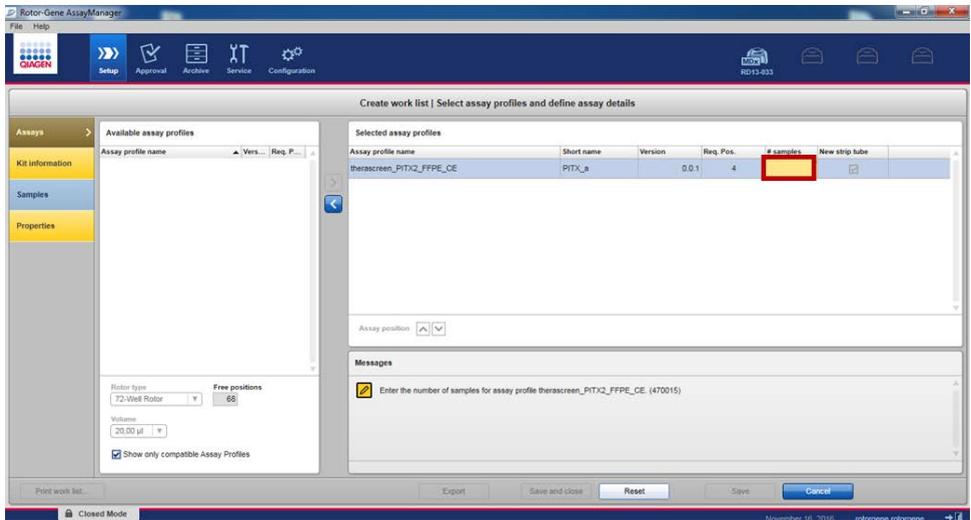


Figure 9. Insérer le nombre d'échantillons.

21. Sélectionner l'onglet « Informations sur le kit ». Insérer les informations sur le kit soit en sélectionnant « Utiliser le code-barres du kit » (et en scannant le code-barres), soit en sélectionnant « Entrer manuellement les informations sur le kit » et en insérant manuellement les informations sur le kit trouvées sur l'étiquette de la boîte du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR :

MAT Numéro de matériel

 Date de péremption

LOT Numéro de lot

22. Sélection l'onglet « Samples » (Échantillons). Une liste contenant les détails des échantillons apparaît. Cette liste représente la disposition attendue du rotor.

23. Saisir le numéro d'identification de l'échantillon ainsi que les informations optionnelles sur l'échantillon sous la forme d'un commentaire pour chaque échantillon (Figure 10).

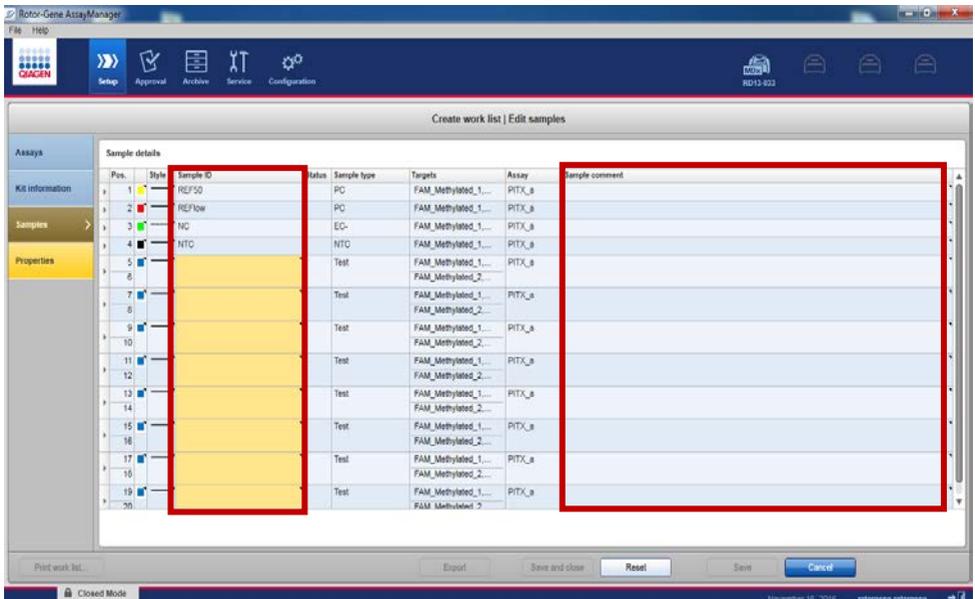


Figure 10. Paramètres de l'échantillon.

24. Sélectionner « Propriétés » et entrer un nom de liste de tâches (Figure 11).

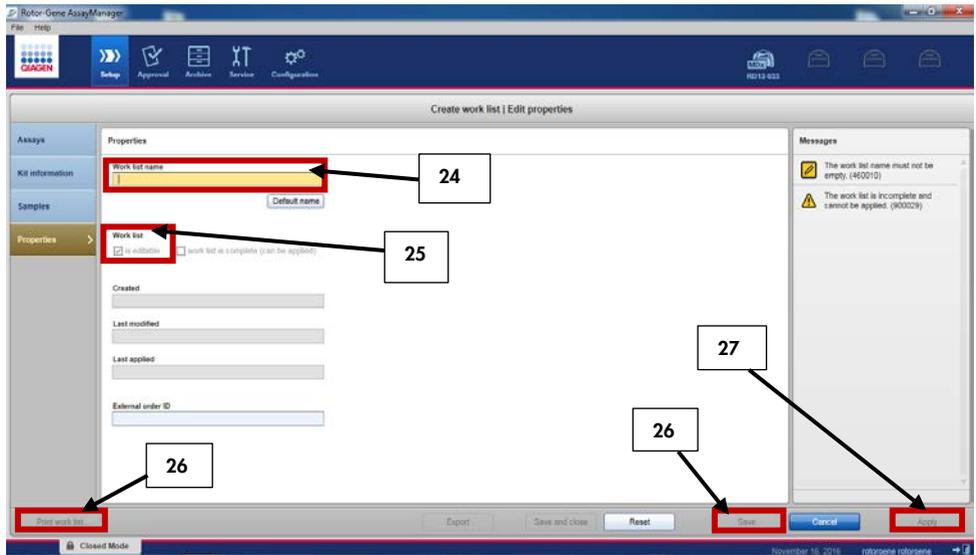


Figure 11. Création d'une liste de tâches.

25. Cocher la case « worklist is complete (can be applied) » [la liste de tâches est complète (peut être appliquée)].

26. Enregistrer la liste de tâches.

En option : appuyer sur « Print work list » (imprimer liste de tâches) pour imprimer la liste de tâches. Imprimer la liste de tâches peut faciliter la préparation et la configuration de l'analyse. Les détails sur les échantillons sont inclus dans la liste de tâches.

27. Sélectionner la liste de tâches correspondante dans le gestionnaire des listes de tâches et cliquer sur « Apply » (appliquer). Sinon, si la liste de tâches est toujours ouverte, cliquer sur « Apply » (appliquer).

Remarque : vérifier que le Rotor-Gene Q MDx est correctement détecté par le logiciel avant de lancer l'analyse.

28. Saisir le nom du test.

29. Sélectionner le thermocycleur à utiliser dans « Cycler Selection » (sélection du thermocycleur).

Remarque : un thermocycleur Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM doit être utilisé.

30. Vérifier que la bague de fermeture est bien fixée et le confirmer à l'écran.

31. Cliquer sur « Start Run » (Démarrer le cycle). L'analyse qPCR devrait démarrer.

Validation et rapport des résultats de la qPCR

La fonctionnalité générale de l'environnement Approval (Approbation) est décrite dans le Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual (*manuel d'utilisation du plug-in Gamma du Rotor-Gene AssayManager v2.1*).

Une fois le cycle achevé et le cycleur libéré, l'expérience sera conservée dans la base de données interne. L'analyse des données acquises est effectuée automatiquement en fonction des règles et valeurs de paramètres définies par le profil de test.

Remarque : l'utilisateur doit avoir un rôle d'« Approver » (approbateur) pour approuver une analyse.

1. Une fois l'analyse terminée, cliquer sur « Finish run » (terminer l'analyse) pour analyser et exporter les données.

Remarque : tant que cette étape n'est pas terminée, l'expérience n'est pas sauvegardée dans la base de données interne.

2. Après avoir cliqué sur « Finish run », entrer le mot de passe et cliquer sur « Release and go to approval » (valider et passer à l'approbation)(Figure 12).

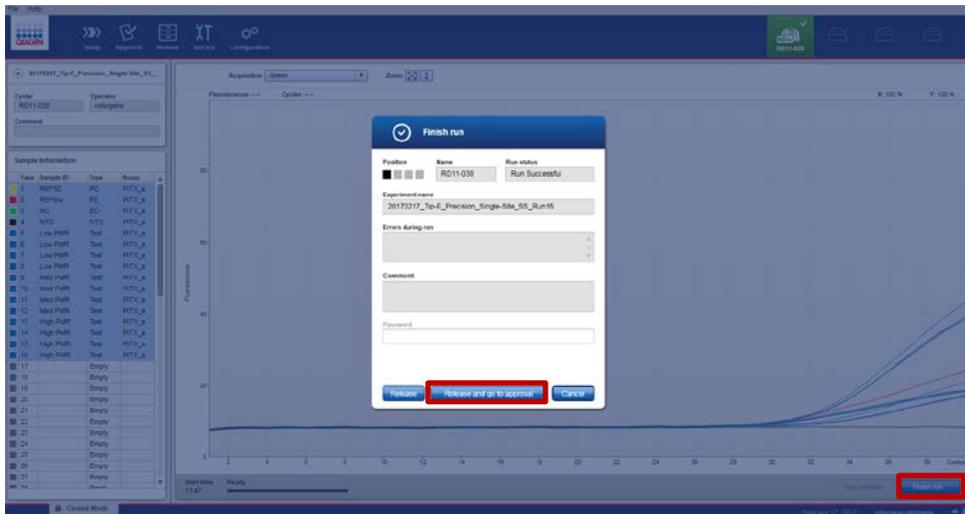


Figure 12. Fin de l'analyse.

Pour les utilisateurs connectés avec un rôle d'« Approver », cliquer sur « Release and go to approval ».

Pour les utilisateurs connectés avec un rôle « Operator » (opérateur), cliquer sur « Release » (valider).

Si l'opérateur a cliqué sur « Release and go to approval », les résultats du test s'affichent dans l'environnement « Approval ».

Si un utilisateur avec un rôle « Operator » a cliqué sur « Release », une personne avec un rôle « Approver » devra se connecter et sélectionner l'environnement « Approval ».

Remarque : dans l'onglet « Approval », les expériences peuvent être analysées en déplaçant chaque onglet (c'est-à-dire, expérience, test, audit, piste, analyse des résultats de contrôle).

3. Vérifier les courbes d'amplification pour chaque échantillon, cocher la première case sur le côté droit de la colonne « Flags » (Indicateurs) (la case devient verte) (Figure 13).

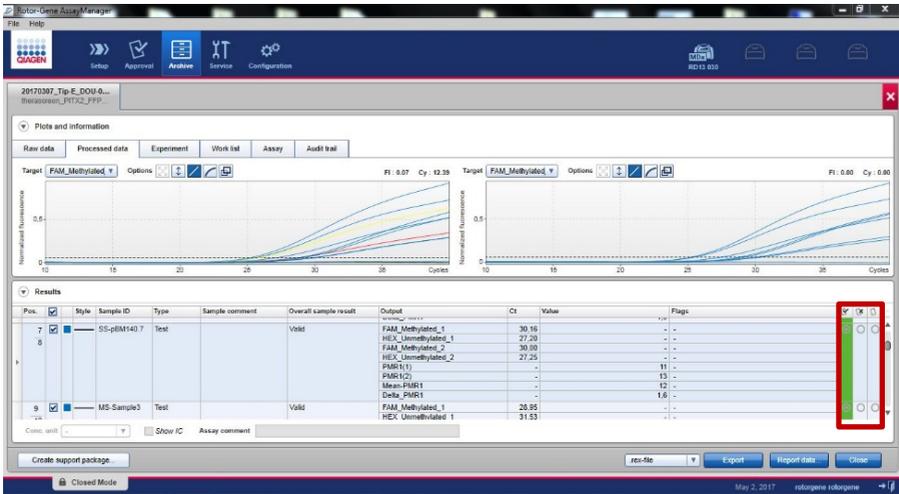


Figure 13. Vérification de la courbe d'amplification.

4. Cliquer sur « Release/report data » (Valider / approuver les données) (en bas à droite de la fenêtre) pour créer un rapport en pdf et pour enregistrer le fichier LIMS (une copie est automatiquement enregistrée dans C:\Documents and settings\AllUsers\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Reports).
5. Fermer le fichier pdf et revenir au Rotor-Gene AssayManager. Cliquer sur « OK » à chaque fois que cela est demandé.
6. Aller dans l'onglet « Archive » pour exporter le fichier .rex. Vérifier que « Start date » (Date de début) et « End date » (Date de fin) sont corrects et cliquer sur « Apply filter » (Appliquer le filtre). Sélectionner l'expérience à exporter, puis cliquer sur « Show assays » (Montrer les tests) (Figure 14).

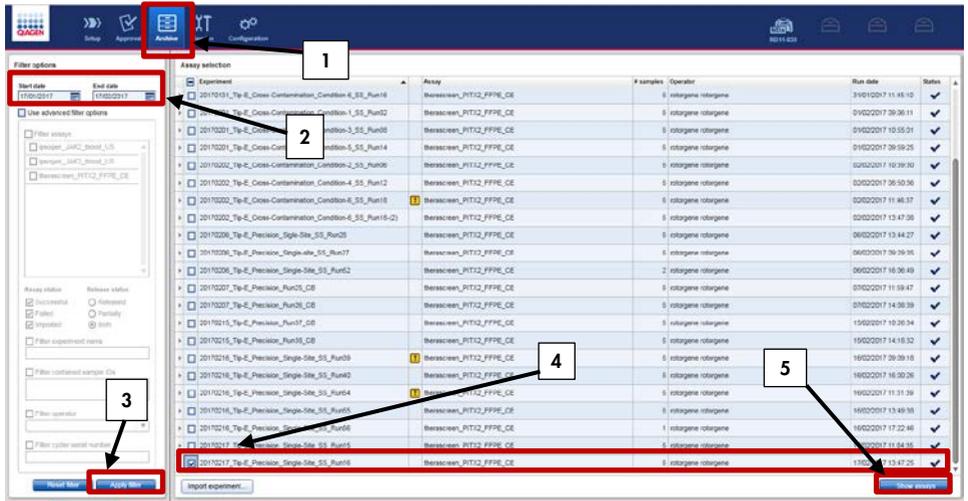


Figure 14. Exporter les données de l'analyse.

7. Exporter le fichier .rex (le fichier en enregistré dans

C:\Documents and settings\AllUsers\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Experiments).

Remarque : le logiciel génère automatiquement un fichier LIMS dans

C:\Documents and settings\All Users\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\LIMS

8. Décharger l'instrument Rotor-Gene Q MDx et jeter les tubes en barrettes conformément aux réglementations de sécurité locales.

Remarque : pour obtenir une assistance de dépannage auprès de l'assistance technique de QIAGEN, il est nécessaire de disposer d'un paquet de soutien pour le test. Il est possible de générer des paquets de soutien dans l'environnement « Approval » ou « Archive ». Pour plus d'informations, voir la section « Création d'un paquet de soutien » dans le manuel d'utilisation de l'application principale du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1.

En plus du paquet de soutien, il pourra être utile de disposer de la piste d'audit à partir de l'incident ± 1 jour. La piste d'audit peut être récupérée dans l'environnement « Service ». Pour plus d'informations, voir le manuel d'utilisation de l'application principale du logiciel *Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

Installation du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 et du plug-in Gamma et importation du profil de test

Le logiciel Rotor-Gene AssayManager version 2.1 doit être installé sur l'ordinateur connecté à l'instrument Rotor-Gene Q MDx. Le logiciel peut être téléchargé à partir de « Operating Software » (logiciel d'exploitation) sous l'onglet « Product Resources »(ressources produit) sur la page du produit Rotor-Gene AssayManager v2.1 : **www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx**.

Pour plus d'informations sur l'installation du logiciel principal Rotor-Gene AssayManager v2.1, consulter le manuel d'utilisation de l'application principale du logiciel *Rotor-Gene AssayManager v2.1*. Pour plus d'informations sur le logiciel supplémentaire à installer sur les ordinateurs connectés, consulter le *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Quick-Start Guide (guide de démarrage rapide du Rotor-Gene AssayManager v2.1)*.

Pour une interprétation automatique des résultats à l'aide du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR avec le Rotor-Gene AssayManager v2.1, le dernier plug-in Gamma doit être installé sur votre Rotor-Gene AssayManager v2.1. Consulter « Product Resources » sur la page du produit Rotor-Gene AssayManager v2.1 : **www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx** pour accéder à la dernière version du plug-in.

Le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR requiert également un profil de test. Le profil de test contient tous les paramètres nécessaires pour la réalisation du cycle et de l'analyse du test PITX2. Ces paramètres sont verrouillés pour l'analyse. Le profil du test PITX2 (AP_therascreen_PITX2_FFPE_CE) correspond à un fichier « iap » qui peut être téléchargé à partir de la page du produit du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR :

www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/therascreen-pitx2-rgq-pcr-kit-ce/ dans l'onglet « Product Resources » sous « Protocol Files » (Fichiers du protocole). Le profil de test doit être importé dans le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Pour plus d'informations sur l'installation du plug-in Gamma et sur l'importation de profils de test dans le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1, procéder de la façon suivante :

1. Télécharger le plug-in Gamma sur le site **www.qiagen.com**.
2. Démarrer le processus d'installation en double-cliquant sur le fichier `GammaPlugIn.Installation.msi`, puis en suivant les instructions d'installation. Pour obtenir une description détaillée de ce processus, se reporter à la section sur l'installation des plug-ins dans le *manuel d'utilisation de l'application principale AssayManager*.
3. Une fois l'installation du plug-in effectuée avec succès, une personne disposant des droits d'administrateur pour le logiciel Rotor-Gene AssayManager devra importer le profil de test de la façon suivante :
4. Aller dans l'explorateur Windows et enregistrer le profil de test dans le fichier suivant :
« C:\Documents and Settings\All Users\Documents\QIAGEN\
Rotor-GeneAssayManager\Import\AssayProfiles ».
5. Ouvrir le logiciel Rotor-Gene AssayManager en cliquant sur  l'icône.
6. Se connecter à Rotor-Gene AssayManager avec son identifiant et son mot de passe. Ne pas changer le « Closed mode » (Mode fermé). Cliquer sur « OK ». L'écran du logiciel Rotor-Gene AssayManager s'ouvre.

7. Sélectionner l'environnement de configuration (Figure 15)

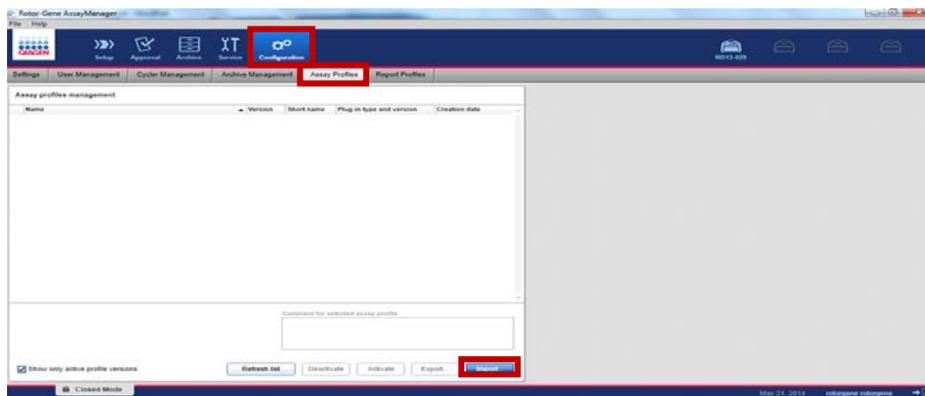


Figure 15. Onglet Configuration.

8. Sélectionner l'onglet « Assay Profiles » (Profils de test).

9. Cliquer sur « Import » (Importer).

10. Sélectionner le profil de test AP_therascreen_PITX2_FFPE_CE_V1.0.x.iap (où x = 1 ou plus) à importer dans la boîte de dialogue, puis cliquer sur « Open » (Ouvrir).

11. Une fois le profil de test importé avec succès, il peut être utilisé dans l'environnement « Setup ».

Interprétation des résultats

Analyse des données

L'analyse des résultats du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR pour chaque contrôle et chaque échantillon est effectuée automatiquement par le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 associé au plug-in Gamme v1.0 et le profil du test PITX2 fait désormais référence au PITX2 Assay Package.

Le PITX2 Assay Package analyse les courbes d'amplification et peut invalider des courbes non-conformes, en fonction de leur forme et de l'amplitude du bruit. Si tel est le cas, un indicateur est associé à la courbe invalidée. Des avertissements peuvent aussi être affichés pour ne pas valider les anomalies de courbes (consulter la liste d'indicateurs et les détails dans la section « Indicateurs », page 61).

Pour déterminer la validité du test, le PITX2 Assay Package analyse également les contrôles de l'analyse, c'est-à-dire, le PITX2 RGQ PCR Reference 50 (REF50), le PITX2 RGQ PCR Reference Low (REFlow), le PITX2 RGQ PCR Negative Control (NC) et le PITX2 RGQ PCR NTC (NTC). La validité de chaque contrôle est basée sur la conformité des valeurs de C_T et/ou du PMR aux spécifications prédéterminées (voir « Résultats globaux des échantillons », page 59 et « Indicateurs », page 61).

Remarque : si au moins un contrôle est non valide, les résultats obtenus pour tous les échantillons de test sont considérés comme non valides et aucun résultat de PMR est affiché.

Le PITX2 Assay Package analyse également les échantillons en vérifiant la validité des échantillons en double et la validité de la quantité (voir « Résultats globaux des échantillons », page 59 et « Indicateurs », page 61). Enfin, une valeur de PMR sans chiffres est assignée aux échantillons au moyen de deux résultats de PMR obtenus pour chaque réplicat d'échantillon. Le PMR obtenu pour chaque échantillon de patient fournira des informations au médecin

traitant afin de savoir si le patient est susceptible de répondre à la chimiothérapie à base d'anthracyclines. Si le PMR obtenu est égal ou inférieur à 12, le patient est susceptible de répondre à la chimiothérapie à base d'anthracyclines. En revanche, si le PMR obtenu est supérieur à 12, un traitement alternatif peut être proposé, puisque le patient a une plus faible probabilité de répondre à la chimiothérapie à base d'anthracyclines (Figure 16).

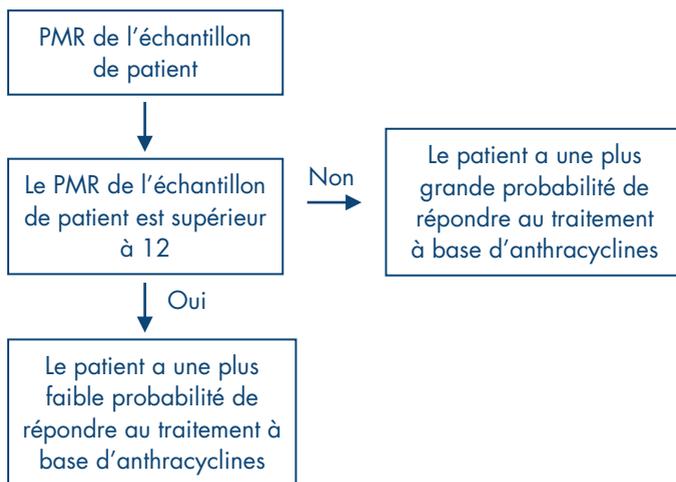


Figure 16. Interprétation des résultats de PMR d'échantillons de patients pour le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR.

Les résultats des échantillons de test sont analysés et définis automatiquement par le PITX2 Assay Package, mais ils doivent être approuvés et validés par un utilisateur connecté avec le rôle « Approuver ». La présence de trois boutons d'approbation supplémentaires à la fin de la ligne dédiée à un échantillon indique que les résultats de cet échantillon doivent être approuvés. Ces boutons servent à accepter ou à rejeter les résultats des échantillons. Pour plus d'informations, se reporter au *manuel d'utilisation du plug-in Gamma du Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

Remarque sur le contrôle du flux de travail : l'échantillon HD216 (contrôle du flux de travail) doit donner une valeur de PMR comprise entre 30 et 50. Si ce PMR est obtenu avec ce contrôle

du flux de travail, l'extraction de l'ADNg et l'étape de traitement au bisulfite peuvent toutes les deux être validées.

En cas de résultats non valides, consulter « Guide de résolution de problèmes », page 66.

Retests

En cas de résultats non valides, des réanalyses sont nécessaires. Si le test est non valide, c'est-à-dire, si un des quatre contrôles est non valide, l'analyse dans son intégralité comprenant tous les échantillons testés doit être retestée. Si le test est valide, mais qu'un ou plusieurs échantillons sont non valides, le ou les échantillons non valides doivent être réanalysés après avoir évalué le type de défaillance (voir « Indicateurs », pages 61, Tableau 6 et Tableau 7 pages 62-63). Un flux de travail pour la procédure de réanalyse est présenté sur la Figure 17.

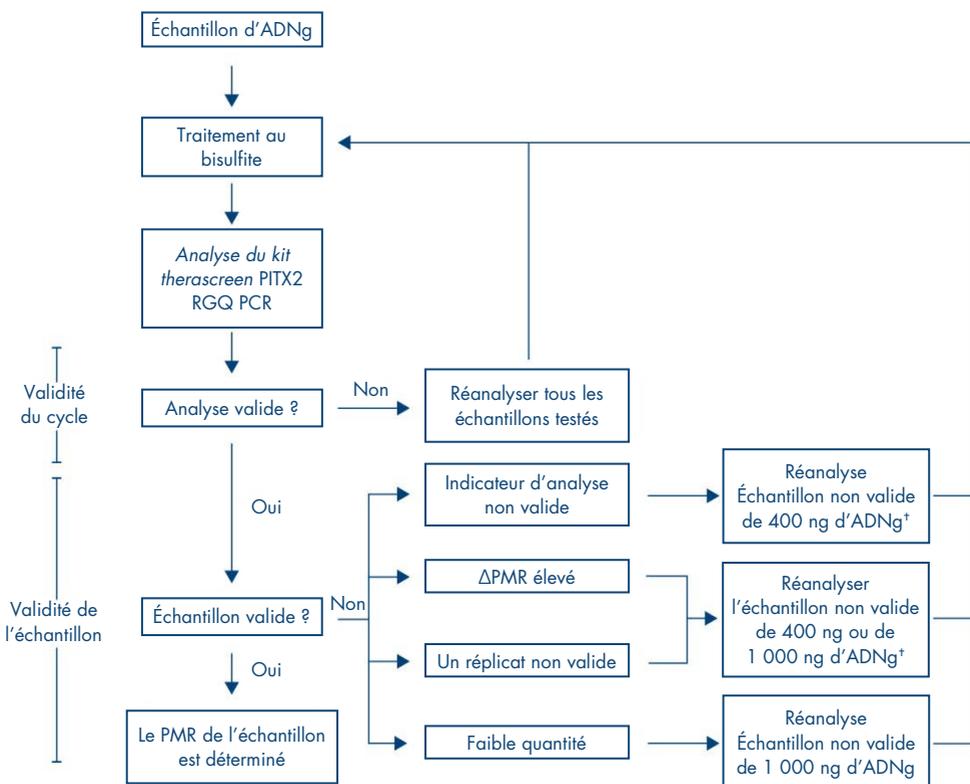


Figure 17. Réanalyser le flux de travail pour le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR.

* Voir Tableau 6 et Tableau 7, pages 62-63.

† Une quantité de 200 ng peut être utilisée si la quantité disponible d'ADNg disponible est insuffisante ; cependant, le risque d'un résultat non valide en raison de l'indicateur « Low Input » est plus élevé.

Affichage des résultats

Cibles et cibles combinées

Les résultats pour chaque réaction du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR sont affichés sous les noms de cibles et de cibles combinées suivants :

- « FAM_Methylated_1 » : résultats du canal vert pour tous les contrôles et pour le réplicat 1 des échantillons de test.
- « FAM_Methylated_2 » : résultats du canal vert pour tous les contrôles et pour le réplicat 2 des échantillons de test.
- « HEX_Unmethylated_1 » : résultats du canal jaune pour tous les contrôles et pour le réplicat 1 des échantillons de test.
- « HEX_Unmethylated_2 » : résultats du canal jaune pour le réplicat 2 des échantillons de test.
- « PMR » : ces cibles sont des cibles combinées ; le résultat correspondant prend en compte la validité des contrôles. Ces cibles sont représentées pour tous les contrôles et échantillons de test s'ils sont valides.
- « PMR moyen » : ces cibles sont des cibles combinées ; le résultat correspondant prend en compte la validité des contrôles. Ces cibles sont représentées pour tous les échantillons de test s'ils sont valides.

Résultats globaux des échantillons

La conclusion de l'analyse pour chaque contrôle et pour chaque échantillon s'affiche dans la colonne « Overall Sample Result » (résultat global de l'échantillon) du rapport (Tableau 4).

Tableau 4. Résultats globaux des échantillons et actions

Résultat global de l'échantillon	Type d'échantillon	Description	Action
Valide	REF50, REFlow, NC, NTC et échantillon de test*	Le contrôle ou l'échantillon de test est valide	S/O
Non valide†	REF50, REFlow, NC, NTC et échantillon de test	Le contrôle est non valide	Répéter l'analyse dans son intégralité
Non valide	Échantillon de test	L'échantillon de test est non valide	Configurer une nouvelle analyse pour répéter le ou les échantillons non valides
Non valide, un réplicat non valide	Échantillon de test	Si une des cibles (FAM_Methylated_1, FAM_Methylated_2, HEX_Unmethylated_1 ou HEX_Unmethylated_2) est non valide, l'échantillon est considéré comme non valide	Configurer une nouvelle analyse pour répéter le ou les échantillons non valides
Non valide, delta PMR élevé‡	Échantillon de test	Si la valeur de delta PMR entre le premier réplicat et le second réplicat est au-dessus d'une valeur spécifique§, l'échantillon est considéré comme non valide	Configurer une nouvelle analyse pour répéter le ou les échantillons non valides

* L'interprétation du résultat de PMR valide pour l'échantillon de test a déjà été expliquée (voir Figure 16).

† Lorsque les contrôles ne sont pas valides, les valeurs de C_T non valides et les résultats de PMR sont affichés entre crochets pour information.

‡ Lorsqu'un échantillon n'est pas validé à cause d'un delta PMR élevé, les valeurs de C_T non valides et les résultats de PMR de l'ensemble des réplicats et le PMR moyen sont affichés pour information. Cependant, l'échantillon doit être réanalysé pour obtenir un résultat valide.

§ La valeur spécifique dépend de la valeur du PMR obtenue pour chaque échantillon (voir Tableau 5, page suivante).

Tableau 5. Critères du Delta PMR

PMR moyen	Delta PMR en double
0-1	≤ 1
1-5	≤ 5
5-10	≤ 7
10-15	≤ 9
15-35	≤ 13
35-65	≤ 15
65-85	≤ 18
85-100	≤ 6

Indicateurs

Les indicateurs s'affichent pour fournir des informations supplémentaires sur les résultats obtenus, en particulier sur les résultats non valides. Les anomalies non problématiques peuvent être indiquées par un indicateur d'avertissement qui ne conduit pas à un résultat non valide. Pour les indicateurs universels inclus dans le plug-in Gamma, se reporter également au manuel d'utilisation du plug-in Gamma du *Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

L'analyse automatisée du test du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR peut fournir à la fois des indicateurs spécifiques- au test (Tableau 6, page suivante) et des indicateurs généraux (Tableau 7, page 63).

Tableau 6. Avertissements spécifiques au test

Indicateur spécifique au test	Type d'échantillon	Description	Action
Indicateurs spécifiques au test pour contrôles			
BELOW_ACCEPTED_RANGE	REF50, REFlow	Le résultat du PMR est en dessous de la plage de valeurs acceptée (< 36 pour REF50, < 2 pour REFlow).	Répéter l'analyse dans son intégralité
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	REF50, REFlow	Le résultat du PMR est au-dessus de la plage de valeurs acceptée (> 65 pour REF50, > 13 pour REFlow).	Répéter l'analyse dans son intégralité
NO_SIGNAL	REF50	La valeur de C _T du FAM_Methylated_1 et/ou du HEX_Unmethylated_1 cible(s) est > 32	Répéter l'analyse dans son intégralité
NO_SIGNAL	REFlow	La valeur de C _T du HEX_Unmethylated_1 cible est > 32	Répéter l'analyse dans son intégralité
Indicateurs spécifiques au test pour les échantillons de test			
PMR_ABOVE_OR_EQUAL_92*	Échantillon de test	Le résultat de PMR est au-dessus de la limite de détection déterminée pour la sonde qui cible les séquences non méthylées précédentes. L'indicateur n'est pas invalidant, il s'agit d'un indicateur d'avertissement.	Aucun
PMR_BELOW_OR_EQUAL_4*	Échantillon de test	Le résultat de PMR est en dessous de la limite de détection déterminée pour la sonde qui cible les séquences méthylées précédentes. L'indicateur n'est pas invalidant, il s'agit d'un indicateur d'avertissement.	Aucun
LOW_INPUT_RETEST_NEEDED	Échantillon de test	Les valeurs de C _T du FAM_Methylated_1 et du HEX_Unmethylated_1 ou du FAM_Methylated_2 et du HEX_Unmethylated_2 cibles sont > 32,5	Augmenter la quantité d'ADNg pour le traitement au bisulfite et répéter l'analyse

* Puisque les résultats de PMR sont donnés sans chiffres mais que le logiciel calcule le PMR avec des chiffres, l'indicateur de limite de détection peut être présent ou non pour les valeurs limites du PMR, c'est-à-dire, 4 et 92. En effet, les indicateurs sont présents pour les résultats de PMR > 92 et < 4, donc des résultats de PMR qui sont par exemple à 4,1 et 91,8 arrondis respectivement à 4 et 92 ne sont pas indiqués comme en dessous ou au-dessus de la limite de détection respectivement.

Remarque : tous les indicateurs représentés ci-dessus sont invalidants, sauf les deux relatifs à la limite de détection. Lorsque les réplicats ne sont pas valides, les valeurs de C_T sont affichées entre crochets pour information, mais le résultat de PMR non valide n'est pas affiché. Et le PMR moyen de l'ensemble des réplicats n'est pas affiché.

Tableau 7. Indicateurs généraux

Indicateur général	Comportement	Description	Action
CONSECUTIVE_FAULT	Non valide	Une cible utilisée pour le calcul de cette cible n'est pas valide.	Répéter l'échantillon ou l'analyse si un contrôle n'est pas valide.
ASSAY_INVALID (ESSAI_NON_VALIDE)	Non valide	Le test n'est pas valide, car au moins un contrôle n'est pas valide	Répéter l'analyse dans son intégralité.
ANALYSIS_FAILED	Non valide	Le test apparaît comme non valide, car l'analyse a échoué pour différentes raisons.	Veillez contacter les services techniques de QIAGEN.
CURVE_SHAPE_ ANOMALY	Non valide	La courbe d'amplification des données brutes dévie par rapport au comportement établi pour ce test. La probabilité de résultats incorrects ou d'une mauvaise interprétation est très élevée.	Répéter l'échantillon ou l'analyse en cas de constatation lors d'un contrôle
FLAT_BUMP (BOSSE_APLATIE)	Non valide	La courbe d'amplification des données brutes présente une forme de bosse aplatie qui s'écarte du comportement établi pour ce test. La probabilité de résultats incorrects ou d'une mauvaise interprétation est très élevée (par ex. détermination de la valeur de C _T fausse).	Répéter l'échantillon ou l'analyse en cas de constatation lors d'un contrôle
INVALID_CALCULATION	Non valide	Le calcul a échoué pour cette cible.	Répéter l'échantillon ou l'analyse en cas de constatation lors d'un contrôle
LOW_FLUORESCENCE_ CHANGE	Avertissement	La variation du pourcentage de fluorescence pour cet échantillon, par rapport au tube d'échantillon présentant la variation de fluorescence la plus élevée, est inférieure à la limite définie.	Aucun
LOW_REACTION_ EFFICIENCY	Avertissement	L'efficacité réactionnelle pour cet échantillon n'a pas atteint une limite définie.	Aucun
MULTIPLE_THRESHOLD_ CROSSING	Non valide	La courbe d'amplification coupe le seuil plus d'une fois. Il est impossible de déterminer un C _T non équivoque.	Répéter l'échantillon ou l'analyse en cas de constatation lors d'un contrôle
NO_BASELINE	Non valide	Aucune ligne de base n'a été trouvée. L'analyse suivante ne peut pas être effectuée.	Répéter l'échantillon ou l'analyse en cas de constatation lors d'un contrôle
RUN_FAILED	Non valide	Le test apparaît comme non valide en raison d'un problème avec le thermocycleur ou la connexion du thermocycleur.	Répéter l'analyse dans son intégralité.

RUN_STOPPED	Non valide	Le test apparaît comme non valide, car l'analyse a été arrêtée manuellement.	Répéter l'analyse dans son intégralité.
SATURATION	Non valide	La fluorescence des données brutes présente une forte saturation avant le point d'inflexion de la courbe d'amplification.	Répéter l'échantillon ou l'analyse en cas de constatation lors d'un contrôle
SATURATION_IN_PLATEAU	Avertissement	La fluorescence des données brutes présente une forte saturation dans la phase de plateau de la courbe d'amplification.	Aucun
SPIKE	Avertissement	Un pic dans la fluorescence des données brutes est détecté dans la courbe d'amplification, mais en dehors de la région de détermination de la valeur de C_T .	Aucun
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Non valide	Un pic est détecté dans la courbe d'amplification à proximité de la valeur de C_T .	Répéter l'échantillon ou l'analyse en cas de constatation lors d'un contrôle
STEEP_BASELINE	Non valide	Une augmentation brutale de la ligne de base dans la fluorescence des données brutes est détectée dans la courbe d'amplification.	Répéter l'échantillon ou l'analyse en cas de constatation lors d'un contrôle
STRONG_BASELINE_DIP	Non valide	Une ligne de base présentant une forte chute est détectée dans la fluorescence sur les données brutes de la courbe d'amplification.	Répéter l'échantillon ou l'analyse en cas de constatation lors d'un contrôle
STRONG_NOISE	Non valide	Un bruit élevé est détecté en dehors de la phase de croissance de la courbe d'amplification.	Répéter l'échantillon ou l'analyse en cas de constatation lors d'un contrôle
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Non valide	Un bruit élevé est détecté dans la phase de croissance (exponentielle) de la courbe d'amplification.	Répéter l'échantillon ou l'analyse en cas de constatation lors d'un contrôle
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Non valide	Une ondulation de ligne de base dans la fluorescence des données brutes est détectée dans la courbe d'amplification.	Répéter l'échantillon ou l'analyse en cas de constatation lors d'un contrôle

Remarque : pour les répliquats d'échantillons présentant un indicateur invalidant, les valeurs de C_T sont affichées entre crochets pour information, mais le résultat de PMR invalide n'est pas affiché. Et le PMR moyen de l'ensemble des répliquats n'est pas affiché.

Guide de résolution de problèmes

Ce guide de résolution de problèmes peut aider à résoudre des problèmes qui pourraient survenir lors de la détermination du PMR chez le promoteur 2 du PITX2 à l'aide du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR. Les scientifiques des services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations et protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et de dosage (pour les coordonnées, visiter le site www.qiagen.com).

Pour des informations concernant la résolution de problèmes relative à la solution de déparaffinage (réf. 19093), au kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (réf 60404) et au kit EpiTect Fast DNA Bisulfite (réf 59824 ou 59826), se reporter aux manuels des kits correspondants.

Pour des informations concernant la résolution de problèmes relative à l'instrument Rotor-Gene Q MDx et au logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1, se reporter aux manuels d'utilisation correspondants.

Commentaires et suggestions

Faible rendement d'ADNg

La quantité d'ADNg extraite est en dessous des 400 ng recommandés pour effectuer le flux de travail du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR

Une quantité de 200 ng peut être utilisée, cependant, le risque d'un résultat non valide en raison de l'indicateur « Low Input » est plus élevé.

Test invalide en raison du REFlow et/ou du REF50 invalide(s)

- | | |
|---|--|
| a) Un composant du mélange réactionnel n'a pas été ajouté | Vérifier que le mélange réactionnel a correctement été préparé (Tableau 3, page 38). Vérifier que tous les composants du mélange réactionnel pour qPCR ont été ajoutés. Répéter l'expérience de PCR. |
| b) Erreur sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx | Vérifier les journaux de maintenance de l'instrument.
Par exemple, un mauvais alignement de la lentille peut entraîner un bruit de fond plus élevé. Si l'alignement de la lentille n'est pas inclus dans votre plan de maintenance, merci de contacter les services techniques de QIAGEN pour plus d'informations et une éventuelle intervention. |

Commentaires et suggestions

- | | |
|--|---|
| c) Erreur sur les accessoires de l'instrument Rotor-Gene Q MDx | Le rotor à 72 puits n'est peut-être pas correctement verrouillé. Répéter l'expérience de PCR. |
| d) Le mélange réactionnel s'est dégradé | Le kit a été congelé / décongelé plus de quatre fois, ou les composants du kit n'ont pas été conservés entre -30 °C et -15 °C, ou le PPM ou le mélange réactionnel n'ont pas été conservés à l'abri de la lumière.
Vérifier les conditions de conservation et la date de péremption (voir l'étiquette) des réactifs et utiliser un nouveau kit. Répéter l'expérience de PCR. |
| e) Inversion du tube en barrette et/ou de l'identifiant de l'échantillon | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Répéter l'expérience de PCR. |
| f) Contrôles manquants ou chargés sur une position incorrecte | S'assurer que le contrôle correct est chargé sur la bonne position. |
| g) Mélange insuffisant des échantillons de contrôle | La décongélation des contrôles n'était pas terminée avant le chargement ou le mélange des contrôles avec le mélange réactionnel (en homogénéisant) n'a pas été correctement effectué. Répéter l'expérience de PCR. |
| h) Volume de pipetage incorrect | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Vérifier qu'un volume de 4 µl de contrôle et qu'un volume de 16 µl de mélange réactionnel pour qPCR ont été ajoutés. Inspecter visuellement tous les volumes pipetés.
Vérifier les pipettes et si nécessaire, les réétalonner avant de répéter l'étape de qPCR. |
| i) Fermeture incomplète du tube | Le tube n'a pas été complètement rebouché, ce qui a entraîné une évaporation lors de l'analyse qPCR. |

Le test est non valide en raison d'un contrôle sans matrice (NTC) ou d'un contrôle négatif (NC) non valide.

- | | |
|---|---|
| a) Contamination croisée ou contamination des réactifs | Toujours manipuler les échantillons, les composants de kits et les consommables selon les pratiques recommandées afin d'éviter toute contamination par effet mémoire.
S'assurer que les embouts sont changés lorsque des réactifs différents sont pipetés ou lorsque des tubes différents sont chargés. Préparer le mélange réactionnel pour qPCR avec le matériel dédié (pipettes, embouts, etc.).
Préparer le mélange réactionnel pour qPCR et la réaction NTC dans une zone spéciale où aucune matrice d'ADN (ADN, plasmides ou produits de PCR) n'est introduite.
Répéter l'expérience de PCR. |
| b) Un composant du mélange réactionnel n'a pas été ajouté | Vérifier que le mélange réactionnel a correctement été préparé (Tableau 3, page 38). Vérifier que tous les composants du mélange réactionnel pour qPCR ont été ajoutés. Répéter l'expérience de PCR. |

Commentaires et suggestions

- | | |
|--|---|
| c) Inversion du tube en barrette et/ou de l'identifiant de l'échantillon | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Répéter l'expérience de qPCR |
| d) Le mélange réactionnel s'est dégradé ou les sondes se sont dégradées | Conserver le contenu du kit entre -30 °C et -15 °C et conserver le PPM à l'abri de la lumière.
Vérifier les conditions de conservation et la date de péremption (voir l'étiquette) des réactifs et utiliser un nouveau kit. Répéter l'expérience de PCR. |
| e) Courbe d'amplification incorrecte (artéfacts) | Vérifier l'amplification correspondante pour les courbes anormales (p. ex., ligne droite).
Répéter l'expérience de qPCR |

Échantillon non valide en raison de l'indicateur « Low Input »

- | | |
|--|---|
| a) Conditions du bloc FFPE | Vérifier les conditions de transport et de conservation du bloc FFPE utilisé. |
| b) Préparation du bloc FFPE | S'assurer que l'échantillon a été fixé dans du formol à 4-10 %. Vérifier qu'une ou deux lames de 5 µm d'épaisseur ont été découpées pour atteindre une surface de tissu de 100 mm ² afin d'avoir un nombre de cellules suffisant. |
| c) Volume de pipetage éventuellement incorrect | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Vérifier qu'un volume de 4 µl d'échantillon et qu'un volume de 16 µl de mélange réactionnel pour qPCR ont été ajoutés. Inspecter visuellement tous les volumes pipetés.
Vérifier les pipettes et si nécessaire, les réétalonner avant de répéter l'étape de qPCR. |
| d) Échec de l'extraction d'ADNg ou du traitement au bisulfite | Vérifier si le contrôle du flux de travail a donné les résultats attendus. S'assurer que le protocole du flux de travail du kit <i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR a été suivi, comme décrit ci-dessus. Vérifier que les kits ne sont pas expirés, que les réactifs sont correctement préparés (p. ex., éthanol ajouté, éviter le transfert de précipités dans la colonne de centrifugation MinElute DNA). Vérifier que la température ambiante n'est pas inférieure à 15 °C pendant la manipulation pour éviter la cristallisation des solutions tampons. Vérifier les conditions de transport et de conservation.
Répéter le flux de travail dans son intégralité. |
| e) Inversion du tube en barrette et/ou de l'identifiant de l'échantillon | Vérifier le schéma de pipetage ou si un tube vide est dans la position correcte et vérifier la configuration de la réaction. Répéter l'expérience de PCR. |
| f) Qualité de l'échantillon d'ADNg insuffisante | Répéter avec plus de produit. Jusqu'à 1 000 ng d'ADN mesuré en utilisant la méthode d'absorbance à 260 nm peut être utilisé. |
| g) Fermeture incomplète du tube | Le tube n'a pas été complètement rebouché, ce qui a entraîné une évaporation lors de l'analyse qPCR. |

Commentaires et suggestions

- h) Échantillon non chargé S'assurer que l'échantillon a été chargé dans l'ensemble des puits.

Échantillon invalide en raison du « Delta PMR high » (Delta PMR élevé)

- a) Le mélange réactionnel s'est dégradé Stocker le contenu du kit entre -30 °C et -15 °C et conserver les mélanges réactionnels à l'abri de la lumière.
Vérifier les conditions de conservation et la date de péremption (voir l'étiquette) des réactifs et utiliser un nouveau kit. Répéter l'expérience de PCR.
- b) Volume de pipetage éventuellement incorrect Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Vérifier qu'un volume de 4 µm d'échantillon / de contrôle et qu'un volume de 16 µl de mélange réactionnel pour qPCR ont été ajoutés. Inspecter visuellement tous les volumes pipetés.
Vérifier les pipettes et si nécessaire, les réétalonner avant de répéter l'étape de qPCR.
- c) Inversion du tube en barrette et/ou de l'identifiant de l'échantillon Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Répéter l'expérience de PCR.
- d) Courbe d'amplification éventuellement incorrecte Vérifier la courbe d'amplification correspondante pour les courbes anormales.
Répéter l'échantillon non valide.
- e) Signal retardé en raison d'une faible quantité, ce qui a entraîné des résultats de PMR plus variables Répéter avec plus de produit. Jusqu'à 1 000 ng d'ADN mesuré en utilisant la méthode d'absorbance à 260 nm peut être utilisé.
- f) Mélange insuffisant des échantillons de contrôle La décongélation du contrôle n'était pas terminée avant le chargement ou le mélange du contrôle avec le mélange réactionnel (en homogénéisant) n'a pas été correctement effectué. Répéter l'expérience de PCR.
- g) Fermeture incomplète du tube Le tube n'a pas été complètement rebouché, ce qui a entraîné une évaporation lors de l'analyse qPCR.

Échantillon non valide en raison d'un « one replicate invalid » (un réplikat non valide)

- a) Matériel insuffisant (proche de la limite) Répéter avec plus de produit. Jusqu'à 1 000 ng d'ADN mesuré en utilisant la méthode d'absorbance à 260 nm peut être utilisé.
- b) Volume de pipetage éventuellement incorrect Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Vérifier qu'un volume de 4 µm d'échantillon / de contrôle et qu'un volume de 16 µl de mélange réactionnel pour qPCR ont été ajoutés. Inspecter visuellement tous les volumes pipetés.
Vérifier les pipettes et si nécessaire, les réétalonner avant de répéter l'étape de qPCR.

Commentaires et suggestions

- | | |
|--|--|
| c) Inversion du tube en barrette et/ou de l'identifiant de l'échantillon | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Répéter l'expérience de PCR. |
| d) Courbe d'amplification éventuellement incorrecte | Vérifier la courbe d'amplification correspondante pour les courbes anormales.
Répéter l'expérience de PCR. |
| e) Mélange insuffisant des échantillons de contrôle | La décongélation du contrôle n'était pas terminée avant le chargement ou le mélange du contrôle avec le mélange réactionnel (en homogénéisant) n'a pas été correctement effectué. Répéter l'expérience de PCR. |
| f) Fermeture incomplète du tube | Le tube n'a pas été complètement rebouché, ce qui a entraîné une évaporation lors de l'analyse qPCR. |
| g) Un puits de l'ensemble des puits pour échantillons n'a pas été chargé | S'assurer que l'échantillon a été chargé dans l'ensemble des puits. |

Échec de l'analyse dû à un signal de fluorescence incohérent dans les contrôles et/ou les échantillons (entre tous les tubes)

- | | |
|---|--|
| Erreur sur les accessoires de l'instrument Rotor-Gene Q MDx | Vérifier les journaux de maintenance de l'instrument.
Le rotor à 72 puits peut être défaillant. |
|---|--|

Contrôle de la qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot de kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR est testé au regard de spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

Le contrôle qualité de la totalité du kit a été effectué sur un instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Ce kit a été fabriqué conformément à la norme ISO 13485. Les certificats d'analyse sont disponibles sur demande à l'adresse suivante : www.qiagen.com/support.

Limitations

Ce kit est réservé à un usage professionnel. Les performances du système sont établies seulement pour des tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) de patients atteints du cancer du sein.

Le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR est seulement validé pour des tissus FFPE de patients atteints du cancer du sein avec un haut risque de ganglions lymphatiques positifs, de récepteurs aux œstrogènes positifs et de HER2-négatif.

Le produit est destiné à être utilisé seulement par des utilisateurs qualifiés, tels que des techniciens et des médecins, formés aux techniques de biologie moléculaire et aux procédures de diagnostics in vitro.

Ce kit doit être utilisé selon instructions données dans le manuel, en association avec les instruments validés mentionnés dans « Matériel nécessaire, mais non fourni » à la page 12.

Tous les réactifs fournis dans le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans le même kit.

Il est important de respecter les dates de péremption imprimées sur l'étiquette de la boîte. Ne pas utiliser de composants périmés.

Le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR n'est validé que pour être utilisé avec la solution de déparaffinage (réf. 19093), le kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (réf 60404) et le kit EpiTect Fast DNA Bisulfite (réf 59824 ou 59826).

Seul l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (pour la PCR) a été validé.

Toute utilisation non conforme de ce produit et/ou modification quelconque de l'un de ses composants décharge QIAGEN de toute responsabilité.

Tous les résultats de diagnostic doivent être générés en tenant compte d'autres résultats cliniques ou de laboratoire.

L'utilisateur est responsable de la validation des performances du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire qui ne sont pas couvertes par les études de performances de QIAGEN.

Caractéristiques de performance

Lors de l'utilisation d'échantillons biologiques dans toutes les études de cette section, l'étape de déparaffinage avant l'extraction de l'ADNg était effectuée avec la solution de déparaffinafe QIAGEN. Noter, cependant, qu'il a été démontré que la solution de déparaffinage et le xylène ou l'histolemon sont équivalents.

Limite du blanc

La limite du blanc (limit of blank, LoB) a été déterminée d'après la norme CLSI/NCCLS EP17-A2 (14) à partir des points de données correspondant au 95^e centile inférieur et supérieur des résultats obtenus avec les échantillons PMR 0 et PMR 100 respectivement. Les échantillons testés correspondent à des échantillons artificiels générés avec différents nombres de copies (100, 200, 500 et 750 copies) d'un plasmide non ciblé (cible de l'autre sonde) avec de l'ADNg non traité en bruit de fond. Les résultats de LoB sont basés sur les mesures 64 et 63 pour les sondes ciblant les séquences méthylées précédentes et les mesures 64 et 61 pour les sondes ciblant les séquences non méthylées précédentes, par lot, à l'aide de deux lots pilotes différents du kit. Les résultats du LoB sont résumés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Résumé des résultats de la limite du blanc

	PMR 0 échantillons		PMR 100 échantillons	
	LoB mesurée, PMR	LoB finale, PMR	LoB mesurée, PMR	LoB finale, PMR
Lot 1	0		99	
Lot 2	0	0	98	98

Limite de détection

Suite à l'analyse Probit d'après la norme CLSI/NCCLS EP17-A2 (14), la limite de détection (limit of detection, LoD) est la valeur de PMR à laquelle 95 % des mesures est supérieure à la LoB. La LoD a été déterminée pour chaque sonde avec la quantité minimale de 200 ng d'ADNg et avec la quantité recommandée de 400 ng d'ADNg à l'aide de deux lots pilotes différents du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR. Il y avait trois échantillons pour chaque quantité testée (200 ng et 400 ng) et pour chaque sonde. Ces échantillons ont été produits avec des nombres de copies amplifiables totaux différents c'est-à-dire, 50, 100 et 150 copies pour la quantité de 200 ng d'ADNg et 100, 200 et 300 copies pour la quantité de 400 ng d'ADNg. Par conséquent, 60 échantillons ont été produits au total pour l'étude de la LoD. Les échantillons testés correspondent à des échantillons artificiels produits à partir de mélanges de plasmides cibles et non cibles (donnant cinq niveaux de PMR théoriques différents par échantillon) avec de l'ADNg non traité en bruit de fond. Pour chaque échantillon testé et pour chaque quantité, les résultats de LoD sont obtenus à partir d'au moins 20 mesures par lot pilote du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR pour chaque niveau de PMR de chaque échantillon. La LoD pour des échantillons avec un PMR faible est de 4 et pour les échantillons avec un PMR élevé est de 92 (Tableau 9).

Tableau 9. Résumé des résultats de la limite de détection

Échantillon	Quantité (ng)	Lot	Valeur de la LOD	Limite inférieure	Limite supérieure
Échantillon avec PMR faible	200	Lot 1	3	3	5
	200	Lot 2	3	3	4
	400	Lot 1	3	2	6
	400	Lot 2	4	3	6
Échantillon avec PMR élevé	200	Lot 1	92	92	92
	200	Lot 2	> 92	S/O	S/O
	400	Lot 1	94	93	95
	400	Lot 2	95	93	95

S/O : Non applicable.

Entrée d'ADN

Cinq quantités différentes d'ADNg (50, 100, 200, 400 et 1 000 ng) ont été testées, chacune présentant sept niveaux différents de PMR (0, 5, 10, 25, 40, 50 et 75). La quantité maximale d'ADNg a été fixée à 1 000 ng pour des raisons techniques, puisqu'une plus grande quantité serait difficile à obtenir dans la vie réelle. La plage de valeurs acceptable concernant la quantité d'ADNg pour le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR a été déterminée avec la régression de Deming à l'aide d'un lot pilote du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR et d'un instrument Rotor-Gene Q MDx.

L'étude a montré que :

- La quantité d'ADNg recommandée pour une utilisation avec le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR est de 400 ng d'ADNg
- La quantité d'ADNg minimale acceptable est de 200 ng d'ADN et la quantité d'ADNg maximale acceptable est de 1 000 ng.
- La quantité d'ADNg minimale acceptable doit être testée uniquement si la quantité recommandée ne peut être atteinte, puisque le risque d'un résultat non valide en raison d'une quantité faible est plus élevé, ce qui augmente la probabilité d'une réanalyse. Il est recommandé de tester la quantité d'ADNg maximale lorsqu'une quantité d'ADNg de 400 ng donne un résultat de PMR invalide, par exemple, en raison d'un indicateur d'une quantité faible.

Linéarité

L'étude de linéarité a été conduite selon la norme CLSI/NCCLS EP6-A (15). La linéarité du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR a été déterminée sur sept échantillons à différents niveaux de PMR (0, 5, 10, 25, 40, 50 et 75) préparés à partir de cinq quantités différentes d'ADNg (comprenant 200, 400 et 1 000 ng). L'étude a été effectuée à l'aide d'un lot pilote *therascreen* PITX2 RGQ PCR sur un instrument Rotor-Gene Q MDx par un opérateur. L'étude a montré que la linéarité est validée pour les échantillons ayant un PMR compris entre 5 et 50 aux quantités d'ADNg acceptables (c'est-à-dire, 200-1 000 ng).

Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité et le reproductibilité du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR ont été déterminées au cours d'une étude de précision sur un seul site et d'une étude de précision multisite, les deux études ont été conduites selon la norme CLSI/NCCLS EP5-A3 (16), voir Tableau 10 et Tableau 11. Les études de précision ont été effectuées sur trois échantillons biologiques ayant un PMR très faible, faible et élevé (9, 16 et 77 respectivement). Dans l'étude de précision sur un seul site, les sources de variabilité ont été étudiées pendant 23 jours ouvrables non consécutifs par trois opérateurs utilisant trois lots pilotes différents du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR et trois instruments Rotor-Gene Q MDx. Deux mesures par échantillon ont été obtenues pour chaque analyse. Deux analyses identiques par jour ont été effectuées avec un intervalle d'au moins deux heures entre chaque analyse. Le temps d'analyse a varié pendant la journée de travail en maintenant un intervalle d'au moins deux heures entre chaque analyse pour que les test soient plus aléatoires. L'étude de précision multisite a été conduite sur trois sites différents où un seul opérateur a utilisé un seul lot pilote du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR sur un seul instrument Rotor-Gene Q MDx. Cinq mesures par échantillon ont été obtenues pour chaque analyse. Une analyse par jour a été effectuée pour chaque site en alternant le matin et l'après-midi.

Tableau 10. Résumé des résultats de l'étude de précision sur un seul site

Échantillon	Source de variabilité (%)						Total
	Analyse intra-laboratoire	Analyse	Lot	Instrument	Opérateur	Jour	
PMR très faible	12,29	4,20	0,00	12,54	0,00	9,49	20,39
PMR faible	19,99	0,00	0,00	3,09	0,00	8,04	21,76
PMR élevé	3,90	0,00	0,00	0,00	0,00	1,64	4,23

Tableau 11. Résumé des résultats de l'étude de précision multisite

Échantillon	Source de variabilité (%)			Total
	Analyse inter-laboratoires	Jour	Site	
PMR très faible	13,90	8,43	4,72	16,93
PMR faible	28,72	0,00	0,00	28,72
PMR élevé	4,25	0,00	1,77	4,61

Substances interférentes

L'étude sur les substances interférentes a été conduite selon la norme CLSI/NCCLS EP7-A2 (17). La concentration finale de chaque substance utilisée lors du flux de travail de la préparation d'échantillon a été évaluée en premier (en prenant en compte l'effet de dilution à chaque étape). En se basant sur l'exactitude de la concentration finale de chaque substance dans le matériel de départ pour le kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR (c'est-à-dire, bisDNA), toutes les substances potentiellement interférentes ont été testées avec un lot pilote du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR. Les résultats n'ont pas montrés que les substances utilisées interféraient pendant le flux de travail du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR (Tableau 12).

Tableau 12. Substances interférentes testées

Substances testées	Volume final testé dans 30 μ l
Solution de déparaffinage	$1,4 \times 10^{-15}$
Histolemon	$2,10 \times 10^{-20}$
Éthanol (96-100 %)	0,50
Solution de bisulfite	$7,2 \times 10^{-09}$
DNA Protect Buffer	$2,26 \times 10^{-10}$
Solution tampon BL	$3,44 \times 10^{-08}$
Solution tampon BW	0,1102
Solution tampon BD	0,002

Contamination croisée

La contamination croisée entre les échantillons négatifs et positifs a été étudiée en utilisant un lot pilote *therascreen* PITX2 RGQ PCR et deux instruments Rotor-Gene Q MDx. Six conditions ont été testées à l'aide du NTC et/ou du Negative Control en tant qu'échantillons négatifs avec ou sans l'échantillon de bisDNA, donnant un PMR faible en tant qu'échantillon positif. La contamination croisée a été évaluée à 1,3 %

Durée d'utilisation

La durée maximale entre la préparation de la plaque et lancement d'une analyse qPCR a été déterminée à l'aide d'un lot pilote *therascreen* PITX2 RGQ PCR et d'un échantillon artificiel généré à partir de plasmides cibles et non cibles donnant un PMR moyen. La durée maximale acceptable est de 24 heures ; cependant, il est recommandé de lancer l'analyse qPCR du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR dès que possible après avoir préparé la plaque (c'est-à-dire, après avoir chargé tous les échantillons à tester).

Validation du seuil clinique

Une analyse prospective a été effectuée pour valider le seuil clinique du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR avec du tissu FFPE de 145 patients atteints du cancer du sein avec des ganglions lymphatiques positifs, des récepteurs aux œstrogènes positifs et un HER2-négatif. Les prélèvements utilisés dans cette étude sont des tissus FFPE archivés ayant les critères suivants :

- Cancer du sein invasif histologiquement confirmé
- Stade primaire de la tumeur pT1, pT2 et pT3
- Implication des ganglions lymphatiques histologiquement confirmée (\geq N1)
- Chimiothérapie adjuvante à base d'anthracyclines standard
- Pas de thérapie par dose-densité
- Aucune autre chimiothérapie systémique primaire (pas de taxanes supplémentaires), sauf l'hormonothérapie

Le PMR a été mesuré pour chaque échantillon en utilisant le format de kit final et les instructions du manuel.

La survie sans maladie (SSM) a été le premier critère d'évaluation clinique et a été définie comme la période entre la chirurgie primaire et le premier évènement SSM documenté. La date de chirurgie primaire a été considérée comme la date de l'index de suivi. Les évènements SSR comprennent la récurrence du cancer (récurrence de la maladie au niveau local ou métastases à distance), les affections malignes considérées comme potentiellement mortelles et les décès de toute origine. Pour les patients qui sont décédés sans récurrence du cancer, une analyse des risques concurrents selon Fine et Gray a été effectuée (13).

La période de suivi de la SSM a été limitée à 10 ans pour cette analyse. Les courbes de survie ont été calculées selon la fonction d'incidence (13). La valeur seuil prédéfinie du PITX2 du PMR égale à 12 a montré une différence statistiquement significative entre les deux groupes pour la SSM en tant que premier critère d'évaluation clinique avec un seuil de signification $p < 0,05$ (bilatéral, valeur alpha). Par conséquent, le taux de méthylation du promoteur de PITX2 évalué à l'aide du test du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR a montré une valeur prédictive pour la chimiothérapie à base d'anthracyclines chez des patients atteints du cancer du sein avec un haut risque de ganglions lymphatiques positifs, de récepteurs aux œstrogènes positifs et de HER2-négatif.

Références

1. Basu, M., Roy, S.S. (2013) Wnt/ β -Catenin pathway is regulated by PITX2 homeodomain protein and thus contributes to the proliferation of human ovarian adenocarcinoma cell, SKOV-3. *J Biol Chem.* **288**, 4355.
2. Chen, F., Chen F., Yao, H., et al. (2016) Suppressing Pitx2 inhibits proliferation and promotes differentiation of iHepSCs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **80**, 154.
3. Fung, F.K., Chan, D.W., Liu, V.W., Leung, T.H., Cheung, A.N., Ngan, H.Y. (2012) Increased expression of PITX2 transcription factor contributes to ovarian cancer progression. *PLoS One* **7**, e37076.
4. Lee, W-L., Chakraborty, P.K., Thévenod, F. (2013) Pituitary homeobox 2 (PITX2) protects renal cancer cell lines against doxorubicin toxicity by transcriptional activation of the multidrug transporter ABCB1. *Int. J. Cancer* **133**, 556.
5. Xu, J., Prosperi, J.R., Choudhury, N., Olopade, O.I., Goss, K.H. (2015) β -Catenin is required for the tumorigenic behavior of triple-negative breast cancer cells. *PLoS One* **10**, e0117097.
6. Lee, W-K., Thévenod, F. (2016) Upregulation of the multidrug resistance P-glycoprotein ABCB1 by transcription factor pituitary homeobox 2 (Pitx2) in human colon and kidney cancers. *FASEB J.* **30** (no. 1 Supplement), 439.2.
7. Maier, S., Nimmrich, I., Koenig, T., et al. (2007) DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients-Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration with the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PathoBiology group. *Eur. J. Cancer* **43**, 1679.
8. Harbeck, N., Nimmrich, I., Hartmann, A., et al. (2008) Multicenter study using paraffin-embedded tumor tissue testing PITX2 DNA-methylation as a marker for outcome prediction in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5036.

9. Hartmann, O., Spyrtos, F., Harbeck, N., et al. (2009) DNA-methylation markers predict outcome in node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **15**, 315.
10. Lesche, R., Martens, J.W.M., Maier, S., et al. (2009) Identification of novel DNA-methylation markers predicting outcome in node-positive, anthracycline-treated breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **100** (supplement), A6009.
11. Foekens, J., Harbeck, N., König, T., et al. (2011) Prognostic markers for prediction of treatment response and/or survival of breast cell proliferative disorder patients. European Patent 2011; EP 1 561 821 B1.
12. Aubele, M., Schmitt, M., Napieralski, R., et al. (2017) The predictive value of PITX2 DNA methylation for high-risk breast cancer therapy: current guidelines, medical needs, and challenges. *Disease Markers*. Article ID 4934608.
13. Fine, J.P., Gray, R.J. (1999) A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J. Am. Stat. Assoc.* **94**, 496.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: Approved Guideline, 2nd ed. CLSI Document EP17A2.- Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2003). Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; approved Guideline, first edition. CLSI Document EP6-A. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014). Evaluation of Precision of Quantitative Procedures; Approved Guideline, third edition. CLSI Document EP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005). Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline, 2nd ed. CLSI Document EP7-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Symboles

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l'emballage et l'étiquetage :

Symbole	Définition du symbole
	Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions
	À utiliser avant
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Symbole CE pour la conformité européenne
	Référence du catalogue
	Numéro de lot
	Numéro de matériel
	Code article international (GTIN)
	Limite de température
	Révision du manuel et n indique le numéro de révision
	Fabricant
	Consulter les instructions d'utilisation
	Conserver à l'abri des rayons du soleil
	Attention

Coordonnées

Pour une assistance technique et plus d'informations, consulter notre Centre d'assistance technique à www.qiagen.com/Support, appeler le 00800-22-44-6000 ou contacter l'un des départements du service technique ou l'un des distributeurs locaux de QIAGEN (voir la quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com).

Pour commander

Produit	Sommaire	Réf.
Kit <i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR — pour déterminer le rapport de méthylation en pourcentage (PMR) chez le promoteur 2 du PITX2.		
<i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR Kit (8)	Pour 8 réactions : PITX2 RGQ PCR Master Mix, PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix, PITX2 RGQ PCR Reference 50, PITX2 RGQ PCR Reference Low, PITX2 RGQ PCR Negative Control et PITX2 RGQ PCR NTC	873211
Plate-forme Rotor-Gene Q MDx, logiciel et accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Thermocycleur PCR en temps réel et analyseur HRM avec 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus un canal HRM, un ordinateur portable, un logiciel, des accessoires ; comprend une garantie d'1 an sur pièces et main-d'œuvre, installation et formation non incluses	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Thermocycleur PCR en temps réel et analyseur HRM avec 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus un canal HRM, un ordinateur portable, un logiciel, des accessoires ; comprend une garantie d'1 an sur pièces et main-d'œuvre, installation et formation non incluses	9002033

Produit	Sommaire	Réf.
Rotor-Gene AssayManager v2.1	Logiciel pour tests de routine en association avec les instruments Rotor-Gene Q and Rotor-Gene Q MDx.	9024203
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloc en aluminium pour configuration de réaction manuelle avec une pipette monocanale dans des tubes 72 x 0,1 ml.	9018901
72-Well Rotor	Pour maintenir les tubes à barrettes et les capuchons de 0,1 ml ; une bague de fermeture rotor à 72 puits est nécessaire	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Pour verrouiller les tubes en barrettes et les capuchons de 0,1 ml dans le rotor à 72 puits	9018904
Rotor Holder	Support métallique autonome pour assembler les tubes et les disques Rotor-Discs® dans les rotors	9018908
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 barrettes de 4 tubes et capuchons pour 1000 réactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 barrettes de 4 tubes et bouchons pour 10 000 réactions	981106
Produits connexes		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pour 50 préparations d'ADN : 50 colonnes QIAamp MinElute, Protéinase K, solutions tampons, tubes de prélèvement	60404
Deparaffinization Solution (16 ml)	Solution de déparaffinage de 16 ml	19093

Produit	Sommaire	Réf.
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (200)	Pour le traitement de 200 ADN : Solution de bisulfite, DNA Protect Buffer, colonnes de centrifugation MinElute DNA, ARN porteur et solutions tampons	59826
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (50)	Pour le traitement de 50 ADN : Solution de bisulfite, DNA Protect Buffer, colonnes de centrifugation MinElute DNA, ARN porteur et solutions tampons	59824

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Ce kit est destiné au diagnostic *in vitro*. Les produits QIAGEN ne peuvent être revendus, modifiés pour la revente ou utilisés pour fabriquer d'autres produits commerciaux sans l'autorisation écrite de QIAGEN.

Les informations contenues dans ce document peuvent être modifiées sans préavis. QIAGEN décline toute responsabilité pour toute éventuelle erreur apparaissant dans ce document. Ce document est considéré comme complet et exact au moment de sa publication. QIAGEN ne pourra en aucun cas être tenu responsable de dommages accessoires, particuliers, multiples ou consécutifs en relation avec, ou découlant de, l'utilisation de ce document.

Les spécifications présentées par les produits QIAGEN sont garanties. La seule obligation de QIAGEN ainsi que le seul recours de tout client sont limités au remplacement sans frais des produits dans le cas où ces derniers ne correspondent pas aux performances garanties.

Marques déposées : QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], QIAxpert[®], EpiTect[®], MinElute[®], *therascreen*[®], Rotor-Disc[®], Rotor-Gene[®], Rotor-Gene AssayManager[®] (QIAGEN Group); FAM[™], HEX[™], NanoDrop[®] (Thermo Fisher Scientific Inc.); TaqMan[®] (Roche Group).

Accord de licence limitée pour le manuel du kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR.

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 avec ce produit et ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans le panel. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce panel avec tout autre composant non fourni dans ce panel, 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. Parmi 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 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 énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce panel et/ou sa ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce panel et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toute licence, expresse ou tacite, autre que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du panel consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au panel et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir le site www.qiagen.com.

Nov-17 HB-2370-001 © 2017 QIAGEN, tous droits réservés.

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