



Juin 2022

Mode d'emploi du *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit



Version 1

IVD

Pour utilisation diagnostique in vitro

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

CE

REF

870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R6 **MAT**

1127512FR

Sommaire

Utilisation prévue.....	5
Résumé et explications	6
Principe de la procédure	7
Format du kit.....	7
Dosages.....	8
Contrôles.....	9
Matériel fourni.....	10
Contenu du kit	10
Matériel nécessaire, mais non fourni	11
Avertissements et précautions	12
Informations de sécurité.....	12
Précautions générales	12
Conservation et manipulation des réactifs	14
Stockage et manipulation des prélèvements	16
Procédure	17
Protocole : détection des mutations d'EGFR.....	18
Protocole : configuration du Rotor-Gene Q pour EGFR.....	22
Analyse des données d'évaluation des mutations	30
Guide de résolution de problèmes	38
Contrôle de la qualité	40
Limitations.....	40
Caractéristiques de performances.....	42

Sensibilité analytique : limite du blanc (limit of blank, LoB)	42
Limite de détection (Limit of Detection, LoD)	42
Sensibilité analytique – seuils ΔC_T et plage seuil ΔC_T	44
Répétabilité et reproductibilité.....	44
Effet de la quantité d'ADN introduit sur les valeurs de C_T	44
Substances interférentes	45
Performances cliniques	49
Références	50
Coordonnées	51
Symboles.....	52
Annexe A : informations sur les mutations.....	54
Pour commander	55
Historique des révisions du document.....	57

Utilisation prévue

Le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit est un test diagnostique in vitro permettant la détection de délétions dans l'exon 19 et de substitutions dans les exons 20 et 21 (T790M et L858R, respectivement) dans le gène du récepteur de facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) et fournissant une évaluation qualitative du statut mutationnel. Les résultats ont pour objectif d'aider le clinicien à identifier les patients atteints de CPNPC qui peuvent bénéficier d'un traitement par IRESSA® (le géfitinib) lorsqu'il n'est pas possible d'évaluer un échantillon de tissu.

Le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit doit être utilisé par un personnel qualifié, dans un environnement de laboratoire professionnel, avec des échantillons d'ADN extraits de plasma obtenu à partir de sang de patients avec cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC).

Le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit est conçu pour une utilisation diagnostique in vitro.

Résumé et explications

Le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit est un kit prêt à l'emploi permettant la détection de mutations de l'oncogène EGFR à l'aide de la réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR) sur les appareils Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Grâce aux technologies Scorpions® et ARMS, le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit permet de détecter les mutations suivantes du gène EGFR par rapport à un fond d'ADN génomique de type sauvage.

- Délétions au niveau de l'exon 19
- T790M
- L858R

Les méthodes utilisées étant hautement sélectives, elles permettent, en fonction de la quantité totale d'ADN présente, de détecter un faible pourcentage de mutations dans un fond d'ADN génomique de type sauvage. Les limites de sélectivité et de détection sont supérieures aux technologies telles que le séquençage avec marquage fluorescent.

Principe de la procédure

Le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit fait appel à deux technologies (ARMS et Scorpions) pour détecter les mutations pendant une real-time PCR.

ARMS

L'amplification spécifique d'allèle ou de mutation s'effectue à l'aide d'ARMS (Amplification Refractory Mutation System). La Taq ADN polymérase (Taq) permet d'établir une distinction efficace entre un appariement et un mésappariement à l'extrémité 3' d'une amorce de PCR. Les séquences aux mutations spécifiques sont amplifiées sélectivement, même dans les échantillons où la majorité des séquences ne porte pas la mutation. Lorsque l'amorce est entièrement appariée, l'efficacité de l'amplification est maximale. Lorsque la base 3' est mésappariée, seule une amplification de faible bruit de fond se produit.

Scorpions

La détection de l'amplification s'effectue à l'aide de la technologie Scorpions. Les molécules Scorpions sont bifonctionnelles et contiennent une amorce de PCR liée par liaison covalente à une sonde. Le fluorophore de cette sonde interagit avec un quencher, qui est également incorporé à la sonde et réduit la fluorescence. Au cours de la PCR, lorsque la sonde s'hybride à l'amplicon, le fluorophore et le quencher se séparent. Cela entraîne une augmentation de la fluorescence dans le tube réactionnel.

Format du kit

Quatre dosages sont fournis dans le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit :

- Un dosage de contrôle (CTRL)
- Trois dosages de mutation

Tous les mélanges réactionnels contiennent les réactifs pour détecter les cibles marquées par FAM™ et un dosage de contrôle interne marqué par HEX™. Le dosage de contrôle interne permet de détecter la présence d'inhibiteurs pouvant entraîner des faux négatifs. L'amplification FAM peut dépasser l'amplification du contrôle interne, dont le but est simplement de montrer qu'en l'absence d'amplification FAM, le résultat est un vrai négatif et non un échec de la PCR.

Dosages

Dosage de contrôle

Le dosage de contrôle, marqué par FAM, est utilisé afin d'évaluer l'ADN total dans l'échantillon. Ce dosage amplifie une région de l'exon 2 du gène EGFR. L'amorce et la sonde ont été conçues de façon à éviter tout polymorphisme connu du gène EGFR.

Dosages de mutation

Chaque dosage de mutation contient une sonde Scorpion marquée par FAM et une amorce ARMS afin de distinguer l'ADN de type sauvage d'un ADN mutant spécifique.

Contrôles

Tous les cycles expérimentaux doivent inclure les contrôles suivants :

Contrôle positif

Chaque cycle doit contenir un contrôle positif dans les tubes 1 à -4. Le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit contient un contrôle positif (Positive Control, PC) d'EGFR à utiliser en tant que matrice dans la réaction du contrôle positif. Les résultats du contrôle positif sont évalués pour garantir que les performances du kit sont conformes aux critères d'acceptation donnés.

Contrôle négatif

Chaque cycle doit contenir un contrôle négatif (No-Template Control, NTC) dans les tubes 9 à 12. Le NTC contient de l'eau exempte de nucléase (H₂O) à utiliser en tant que « matrice » pour le contrôle sans matrice. Le contrôle sans matrice est utilisé pour évaluer toute contamination potentielle durant la configuration du cycle et pour évaluer les performances de la réaction du contrôle interne.

Évaluation de la réaction du contrôle interne

Chaque mélange réactionnel contient un contrôle interne en plus de la réaction cible. Un échec indique la présence éventuelle d'inhibiteurs, susceptibles d'entraîner des faux négatifs, ou la survenue d'une erreur de configuration de l'opérateur pour ce tube.

En cas d'échec du contrôle interne dû à l'inhibition de la PCR, la dilution de l'échantillon peut réduire l'effet des inhibiteurs, mais il faut prendre en compte que cela entraîne aussi la dilution de l'ADN cible. L'amplification FAM peut dépasser l'amplification du contrôle interne (CI), de sorte que la valeur CT du CI (HEX) peut se trouver en dehors de l'intervalle spécifié. Les résultats FAM demeurent valides pour ces échantillons.

Matériel fourni

Contenu du kit

<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			(24)
N° de référence			870311
Nombre de réactions			24
Rouge	Control Reaction Mix (Mélange réactionnel de contrôle)	Ctrl	2 x 600 µl
Violet	T790M Reaction Mix (Mélange réactionnel pour T790M)	T790M	600 µl
Orange	Deletions Reaction Mix (Mélange réactionnel pour délétions)	Del	600 µl
Rose	L858R Reaction Mix (Mélange réactionnel pour L858R)	L858R	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (Contrôle positif EGFR)	PC	300 µl
Menthe	Taq DNA Polymerase (Taq ADN polymérase)	Taq	2 x 80 µl
Blanc	Nuclease-free water for No Template Control (Eau exempte de nucléase pour contrôle sans matrice)	NTC	1 x 1,9 ml
Blanc	Nuclease-free water for Dilution (Eau exempte de nucléase pour dilution)	Dil	1 x 1,9 ml
Mode d'emploi (manuel) du <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			1

Matériel nécessaire, mais non fourni

Lors de la manipulation de produits chimiques, porter systématiquement 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) appropriées, disponibles auprès du fournisseur des produits.

- Kit d'extraction d'ADN (voir la section « Procédure » page 17)
- Pipettes dédiées* (réglables) pour la préparation des échantillons
- Pipettes dédiées* (adaptables) pour la préparation du Master Mix PCR
- Pipettes dédiées* (adaptables) pour la distribution de l'ADN matriciel
- Pointes de pipette avec filtres exemptes de DNase, de RNase et d'ADN (pour éviter les contaminations croisées, nous recommandons des pointes de pipette avec barrières antiaérosols)
- Bain-marie ou dispositif semblable capable de maintenir des tubes de centrifugation de 50 ml à 60 °C.
- Bloc chauffant ou dispositif semblable capable d'incuber à 56 °C†
- Glace pilée
- Centrifugeuse de paillasse* avec rotor pour tubes réactionnels de 2 ml
- Vortex
- Appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* † avec canaux de fluorescence pour Cycling Green et Cycling Yellow (pour la détection de FAM et HEX, respectivement)
- Logiciel Rotor-Gene Q version 2.3.5 ou supérieure
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, pour utilisation avec un rotor à 72 puits (N° de réf. 981103 ou 981106)
- Tubes de microcentrifugation exemptes de DNase, de RNase et d'ADN pour la préparation des Master Mixes
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes : bloc en aluminium pour préparation de réaction manuelle avec pipette monocanal (QIAGEN, N° de réf. 9018901)

* Vérifier que les instruments ont été contrôlés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

† Dans certains pays, le cas échéant, il est possible d'utiliser l'instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM produit en mai 2011 ou ultérieurement. La date de production peut être obtenue à partir du numéro de série à l'arrière de l'instrument. Le numéro de série est affiché au format « mmaann » où « mm » correspond au mois de production en chiffres, « aa » correspond aux deux derniers chiffres de l'année de production et « nn » est l'identifiant unique de l'appareil.

Avertissements et précautions

Pour utilisation diagnostique in vitro

Réservé à un usage professionnel

Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, porter systématiquement 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) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF, pratique et compact, à l'adresse www.qiagen.com/safety, où il est possible de trouver, de consulter et d'imprimer les FDS de chaque kit et composant de kit QIAGEN.

Précautions générales

L'utilisateur doit toujours respecter les mesures suivantes :

- Utiliser des pointes de pipette avec filtres exemptes de DNase, de RNase et d'ADN et s'assurer que les pipettes ont été calibrées conformément aux instructions du fabricant.
- Conserver et extraire le matériel positif (prélèvements et contrôles positifs) séparément de tous les autres réactifs, puis les ajouter au mélange réactionnel dans un emplacement suffisamment distant.
- Décongeler complètement tous les composants à température ambiante (de 15 à 25 °C) avant de commencer un dosage.
- Lorsqu'ils sont décongelés, mélanger les composants en retournant 10 fois chaque tube et les centrifuger brièvement.

Remarque : Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination des PCR avec le matériel de contrôle synthétique. Il est recommandé d'utiliser des pipettes individuelles dédiées pour préparer les mélanges réactionnels et ajouter l'ADN matrice. La préparation et

la distribution des mélanges réactionnels doivent être effectuées dans une zone distincte de la zone utilisée pour l'addition de la matrice. Les tubes du Rotor-Gene Q ne doivent pas être ouverts après la fin du cycle de PCR. Cela permet d'éviter toute contamination de laboratoire avec les produits post-PCR.

Remarque : les réactifs sont validés pour une préparation manuelle. Dans le cadre d'une méthode automatisée, le nombre de réactions possibles peut être diminué en raison des réactifs nécessaires pour remplir les « volumes morts » sur ces appareils.

Remarque : tous les réactifs du *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit sont formulés pour être utilisés spécifiquement avec les tests indiqués. Tous les réactifs fournis dans le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit sont conçus pour être utilisés uniquement avec les autres réactifs du même *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Afin de garantir des performances optimales, les réactifs de ce kit ne doivent pas être échangés.

Remarque : utiliser uniquement la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) fournie dans le kit. Ne pas la remplacer par de la *Taq* ADN polymérase d'autres kits du même type ou de type différent ni par de la *Taq* ADN polymérase d'un autre fournisseur.

Remarque : les réactifs du *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ont été dilués de manière optimale. Aucune dilution supplémentaire des réactifs n'est recommandée : celle-ci pourrait entraîner une baisse des performances. L'utilisation de volumes réactionnels inférieurs à 25 µl n'est pas recommandée, car cela augmente le risque de faux négatifs.

Conservation et manipulation des réactifs

Le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit est expédié sur un lit de carboglace. Si l'un des composants du *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit arrive non congelé, si l'emballage externe a été ouvert au cours du transport ou si le colis ne contient pas la notice d'emballage, le mode d'emploi ou les réactifs, contacter l'un des Services techniques ou l'un des distributeurs locaux de QIAGEN (visiter le site www.qiagen.com).

Le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit doit être stocké dès réception à une température comprise entre -30 et -15 °C dans un congélateur à température constante et à l'abri de la lumière. Lorsqu'il est stocké dans les conditions de conservation spécifiées, le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit 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 pendant 12 mois, ou jusqu'à la date d'expiration indiquée si elle survient avant. Éviter de répéter les cycles de congélation-décongélation. Ne pas dépasser un maximum de huit cycles de congélation/décongélation.

Les réactifs doivent être décongelés à température ambiante pendant 1 heure au minimum et 4,5 heures au maximum. Une fois les réactifs prêts à l'utilisation, les PCR peuvent être préparées et les tubes du Rotor-Gene Q contenant les Master Mixes et l'échantillon d'ADN doivent être chargés immédiatement sur le Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. La durée totale, depuis le début de la préparation de la PCR jusqu'au démarrage du cycle, ne doit pas dépasser :

- 6 heures en cas de conservation à température ambiante
Remarque : cette durée inclut la préparation et le stockage de la PCR.
- 18 heures en cas de conservation au réfrigérateur (2 à 8 °C)
Remarque : cette durée inclut la préparation et le stockage de la PCR.

Remarque : les sondes Scorpions (comme toutes les molécules marquées en fluorescence) présentes dans les réactifs du mélange réactionnel sont photosensibles. Placer les réactifs du contrôle et du mélange réactionnel à l'abri de la lumière afin d'éviter tout photoblanchiment.

Les réactifs du *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit sont dilués de façon optimale et ne nécessitent aucune purification ni aucun traitement supplémentaire avant l'analyse, comme indiqué dans le *mode d'emploi (manuel) du theascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit*.

Prêter attention aux dates de péremption et aux conditions de stockage imprimées sur l'emballage et les étiquettes des composants. Ne pas utiliser de composants périmés ou stockés dans de mauvaises conditions.

Stockage et manipulation des prélèvements

Remarque : tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Le matériau d'échantillon doit être constitué d'ADN génomique humain extrait de plasma. Les prélèvements doivent être transportés conformément aux normes méthodologiques en pathologie pour garantir leur bonne qualité.

Procédure

Extraction d'ADN

Les caractéristiques de performances de ce kit ont été déterminées à l'aide d'ADN extrait avec le QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (N° de réf. 55114). Lors de l'utilisation du QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, procéder à l'extraction de l'ADN conformément aux instructions du manuel en tenant compte des points suivants :

- Le volume de départ du plasma est de 2 ml.
- Avant l'extraction de l'ADN, il faut centrifuger 2 ml de plasma à 3000 tr/min pendant 2 minutes et transférer le surnageant dans un tube propre.
- Le volume de protéinase K doit être de 250 µl.
- La digestion de la protéinase K doit être effectuée pendant 1 heure à 60 °C.
- L'ADN génomique purifié doit être élué dans 55 µl de Buffer AVE (fourni dans le QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit).
- Conserver l'ADN génomique purifié entre -30 et -15 °C.

Remarque : tous les dosages du *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit génèrent des produits de PCR courts. Toutefois, le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ne fonctionne pas avec de l'ADN fortement fragmenté.

Protocole : détection des mutations d'EGFR

Points importants avant de commencer

- Pour obtenir des résultats corrects, assurez-vous que la procédure de mélange décrite est suivie à chaque étape de mélange du processus de configuration du dosage.
- Il est possible d'évaluer jusqu'à 16 échantillons par cycle.
- Avant de commencer la procédure, lire la section « Précautions générales » page 12.
- Prendre le temps de se familiariser avec l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM avant de démarrer le protocole. Consulter le manuel d'utilisation de l'appareil.
- Ne pas vortexer la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) ou tout mélange contenant de la *Taq* ADN polymérase, car cela risquerait de désactiver cette enzyme.
- Pipetter la *Taq* en disposant la pointe de la pipette juste sous la surface du liquide afin d'éviter qu'elle se recouvre d'un excès d'enzyme.
- Pour chaque échantillon d'ADN, les dosages de contrôle et de mutation doivent être analysés dans le même cycle de PCR afin d'éviter toute variation intercycle.
- Pour une utilisation efficace des réactifs du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, regrouper autant que possible les échantillons d'ADN par lots pour obtenir des cycles complets. Le fait de tester les échantillons individuellement ou en petits nombres consomme plus de réactifs et réduit la quantité totale d'échantillons pouvant être testés avec un seul *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Étapes préliminaires

- Avant chaque utilisation, veiller à décongeler complètement tous les réactifs pendant une durée comprise entre 1 heure et 4,5 heures à température ambiante (entre 15 et 25°C), à les mélanger 10 fois par inversion, puis à les centrifuger brièvement afin de prélever le contenu au fond du tube.
- Veiller à ce que la *Taq* soit à température ambiante (15 à 25 °C) avant chaque utilisation. Centrifuger brièvement le tube afin que toute l'enzyme soit rassemblée au fond du tube.
- Mélanger tous les échantillons en les retournant 10 fois et les centrifuger brièvement afin que le contenu soit rassemblé au fond des tubes.

Procédure

1. Décongeler complètement tous les mélanges réactionnels, l'eau exempte de nucléase pour NTC et le contrôle positif (Positive Control, PC) EGFR à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pendant au moins 1 heure (tableau 1). Une fois les réactifs décongelés, les mélanger en retournant chaque tube 10 fois pour éviter les concentrations locales de sels, puis les centrifuger brièvement afin de prélever le contenu au fond du tube.

Tableau 1. Durée de décongélation, durée de préparation de la PCR et températures de stockage

Durée minimale de décongélation	Durée maximale de décongélation	Température de stockage après préparation de la PCR	Durée maximale de préparation et de stockage de la PCR
1 heure	4,5 heures	Température ambiante (15 à 25 °C)	6 heures
1 heure	4,5 heures	2 à 8 °C	18 heures

Remarque : la préparation de la PCR doit s'effectuer à température ambiante. Le terme « stockage » désigne la durée entre l'achèvement de la préparation de la PCR et le début cycle de PCR sur le Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Remarque : amener la *Taq* ADN polymérase (tube *Taq*) à température ambiante (15 à 25 °C) en même temps que les autres réactifs (voir la section « Conservation et manipulation des réactifs » page 14). Centrifuger brièvement le tube afin que toute l'enzyme soit rassemblée au fond du tube.

2. Procéder aux étapes suivantes :
 - 2a. Marquer quatre tubes de microcentrifugation (non fournis) conformément aux mélanges réactionnels indiqués dans le tableau 2.
 - 2b. Préparer suffisamment de Master Mixes (mélange réactionnel du contrôle ou des mutations [tube CTRL, T790M, Del, L858R] plus *Taq* ADN polymérase [*Taq*]) pour les échantillons d'ADN, un tube de contrôle positif EGFR (tube PC) et un tube d'eau exempte de nucléase pour NTC (tube NTC) conformément aux volumes indiqués dans le tableau 2.

Remarque : Inclure des réactifs pour un échantillon supplémentaire afin de disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR.

Les Master Mixes contiennent tous les composants nécessaires pour la PCR, excepté l'échantillon.

Tableau 2. Préparation des Master Mixes*

Dosage	Tube de mélange réactionnel	Volume de mélange réactionnel	Volume de Taq ADN polymérase (tube Taq)
Contrôle	CTRL	19,50 µl x (n+1)	0,50 µl x (n+1)
T790M	T790M	19,50 µl x (n+1)	0,50 µl x (n+1)
Délétions	Del	19,50 µl x (n+1)	0,50 µl x (n+1)
L858R	L858R	19,50 µl x (n+1)	0,50 µl x (n+1)

* Lors de la préparation du Master Mix, en préparer suffisamment pour un échantillon supplémentaire afin de disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR.

Remarque : lors de la préparation du Master Mix, le volume de mélange réactionnel nécessaire pour le contrôle ou les mutations est ajouté en premier au tube correspondant et la Taq ADN polymérase est ajoutée en dernier.

- Placer le nombre approprié de barrettes de 4 tubes de PCR (chaque barrette contient 4 tubes) dans le bloc de chargement comme indiqué dans le tableau 3. Ne pas fermer les tubes.

Remarque : laisser les capuchons dans le récipient en plastique pendant le temps nécessaire.

- Fermer le tube de Master Mix et le retourner 10 fois afin de le mélanger, puis centrifuger brièvement pour faire en sorte que le mélange soit au fond du tube. Ajouter immédiatement 20 µl de Master Mix dans chaque tube de PCR en barrettes correspondant.
- Ajouter immédiatement 5 µl d'eau exempte de nucléase (H₂O) dans les tubes PCR de contrôle négatif (tubes de PCR en barrettes 9 à 12) et fermer les tubes.
- Ajouter 5 µl de chaque échantillon dans les tubes d'échantillons (tubes de PCR 5 à 8, 13 à 16 et 17 à 72) et fermer les tubes.
- Ajouter 5 µl de contrôle positif (Positive Control, PC) EGFR dans les tubes de contrôle positif (tubes de PCR 1 à 4). Chaque échantillon d'ADN doit être testé avec le contrôle et avec tous les dosages de mutation. La répartition des tubes est indiquée dans le tableau 3.

Tableau 3. Répartition des tubes pour les dosages de contrôle et de mutation

Dosage	Contrôles		Numéro d'échantillon						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Ctrl	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Délétions	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
Numéro d'échantillon									
Dosage	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ctrl	5	13	21	29	37	45	53	61	69
T790M	6	14	22	30	38	46	54	62	70
Délétions	7	15	23	31	39	47	55	63	71
L858R	8	16	24	32	40	48	56	64	72

8. À l'aide d'un marqueur permanent, marquer le couvercle des premiers tubes se trouvant dans les positions numériques les plus faibles de chaque barrette de 4 tubes de PCR (p. ex. positions 1, 5, 9, etc.) pour indiquer l'orientation du chargement des tubes dans le rotor à 72 puits du Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. Retourner 4 fois les tubes fermés pour homogénéiser l'échantillon et le mélange réactionnel.
10. Placer toutes les barrettes de 4 tubes de PCR dans les positions appropriées du rotor à 72 puits et vérifier visuellement que les tubes contiennent tous le même volume.
Remarque : veiller à ne pas inverser les barrettes de tubes lors de leur transfert dans le rotor.
11. Si le rotor n'est pas plein, remplir les espaces restants avec des tubes vides fermés.
12. Placer immédiatement le rotor dans le Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Veiller à ce que la bague de verrouillage (un accessoire du Rotor-Gene Q MDx) soit placée au-dessus du rotor pour que les tubes ne bougent pas lors du cycle.
13. Consulter les instructions de configuration du Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (voir la section « Protocole de configuration du Rotor-Gene Q pour EGFR » page 22) pour créer le profil de température et démarrer le cycle.

Protocole : configuration du Rotor-Gene Q pour EGFR

Les paramètres des cycles sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4. Paramètres des cycles

Cycles	Température	Durée	Acquisition de données
1	95 °C	15 minutes	Aucun
40	95 °C	30 secondes	Aucun
	60 °C	60 secondes	Green et Yellow

1. Double-cliquer sur l'icône du logiciel Rotor-Gene Q version 2.3 sur le bureau de l'ordinateur portable connecté au Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Sélectionner l'onglet « Advanced » (Avancé) dans la boîte de dialogue « New Run » (Nouveau cycle) qui s'affiche.
2. Pour créer un nouveau modèle, sélectionner Empty Run (Cycle vierge), puis cliquer sur New (Nouveau).
La fenêtre « New Run Wizard » (Assistant nouveau cycle) apparaît.
3. Sélectionner 72-Well Rotor (Rotor à 72 puits) comme type de rotor. Veiller à ce que la bague de verrouillage soit correctement fixé et cocher la case Locking Ring Attached (Bague de verrouillage fixée). Cliquer sur Next (Suivant) (figure 1).

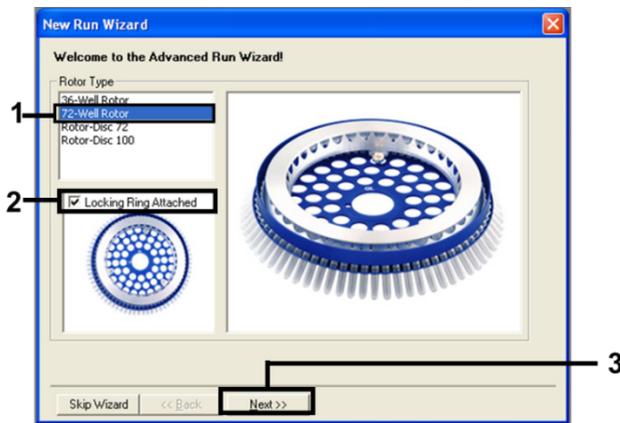


Figure 1. Boîte de dialogue « New Run Wizard » (Assistant nouveau cycle).

4. Saisir le nom de l'opérateur dans le champ Operator (Opérateur). Ajouter toute remarque et configurer la valeur du champ Reaction volume (Volume réactionnel) sur 25. Vérifier que les valeurs 1, 2, 3... figurent dans le champ Sample Layout (Répartition des échantillons). Cliquer sur Next (Suivant) (figure 2).

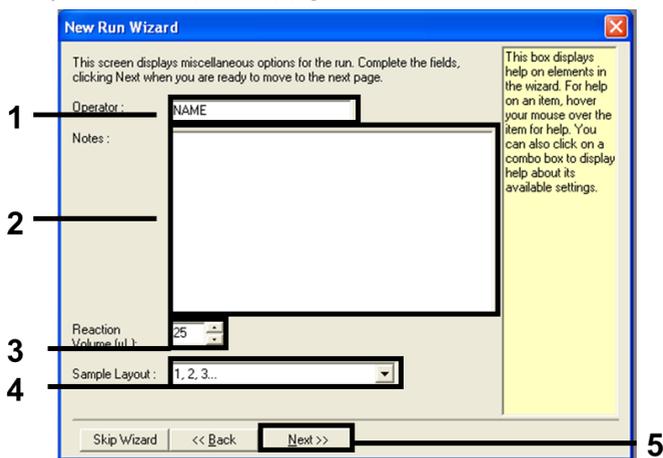


Figure 2. Saisie du nom de l'opérateur et des volumes réactionnels.

5. Cliquer sur « Edit Profile » (Modifier le profil) dans la boîte de dialogue « New Run Wizard » (Assistant nouveau cycle) (figure 3) puis définir les paramètres des cycles comme indiqué dans les étapes suivantes.



Figure 3. Modification du profil.

6. Cliquer sur Insert after (Insérer après) puis sélectionner New Hold at Temperature (Nouveau palier de température) (figure 4).

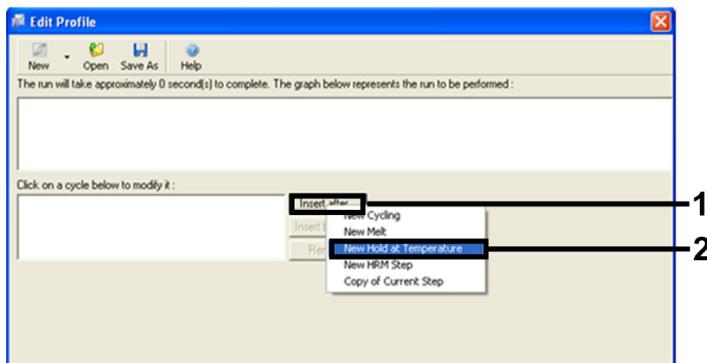


Figure 4. Insertion d'une étape d'incubation initiale.

7. Attribuer au champ Hold Temperature (Température du palier) une valeur de 95 °C et attribuer au champ Hold Time (Durée du palier) une valeur de 15 mins 0 secs (15 min et 0 s). Cliquer sur Insert After (Insérer après) puis sélectionner New Cycling (Nouveau cycle) (figure 5).

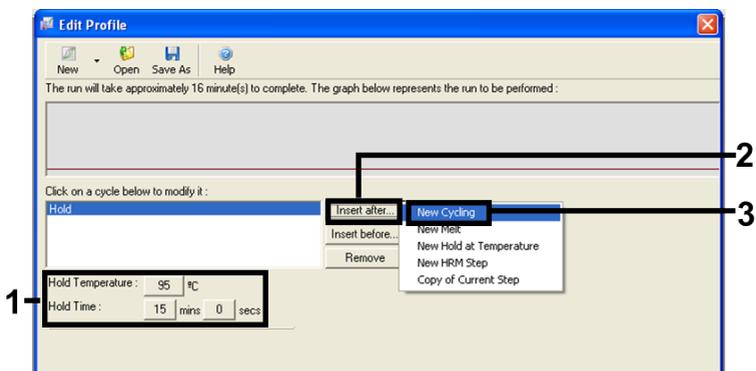


Figure 5. Étape d'incubation initiale à 95 °C.

8. Attribuer au nombre de répétitions de cycles une valeur de 40. Sélectionner la première étape et la définir sur 95 °C pendant 30 secondes (figure 6).

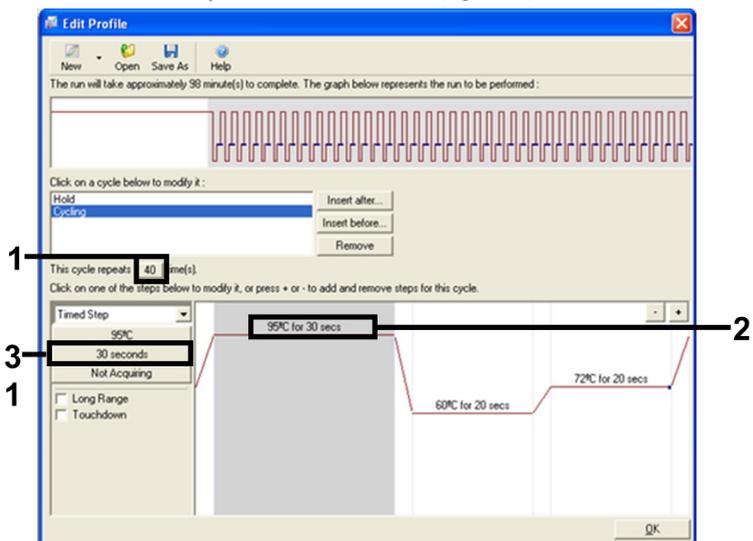


Figure 6. Étape de cycle à 95 °C.

9. Mettre la deuxième étape en surbrillance et la définir sur 60 °C pendant 60 secondes. Cliquer sur Not Acquiring (Pas d'acquisition) pour activer l'acquisition de données pendant cette étape. (figure 7).

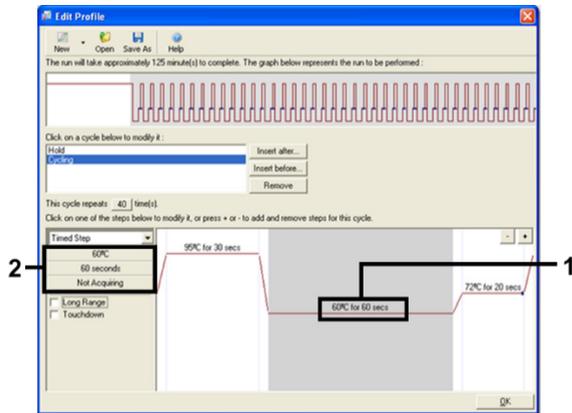


Figure 7. Étape de cycle à 60 °C.

10. Sélectionner Green (Vert) et Yellow (Jaune) dans la liste Available Channels (Canaux disponibles), puis cliquer sur > pour les transférer vers la liste Acquiring Channels (Canaux d'acquisition). Cliquer sur OK (figure 8).

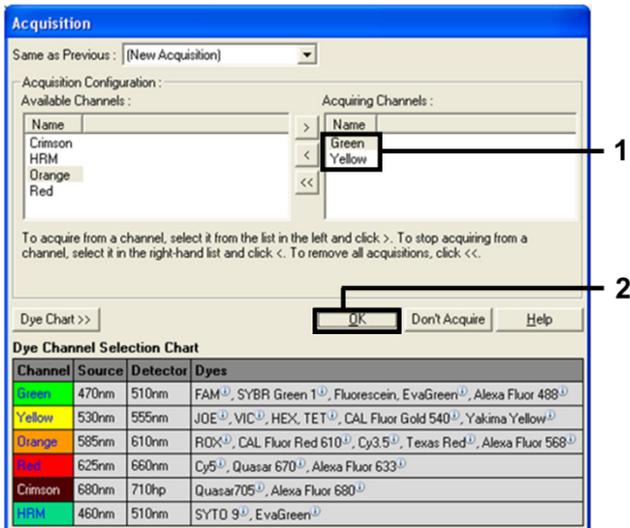


Figure 8. Acquisition à l'étape de cycle à 60 °C.

11. Mettre la troisième étape en surbrillance et cliquer sur le bouton - pour la supprimer. Cliquer sur OK (figure 9).

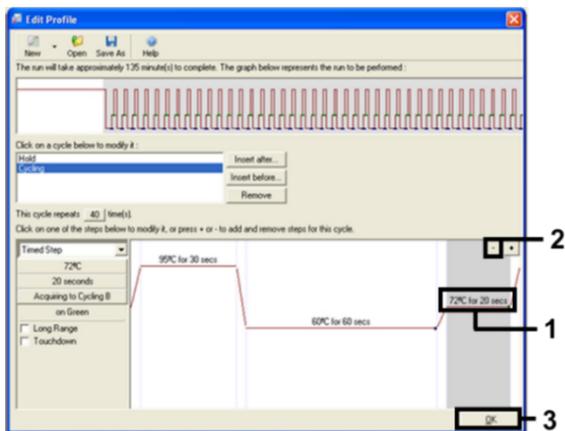


Figure 9. Suppression de l'étape d'élongation.

12. Dans la boîte de dialogue suivante, cliquer sur Gain Optimisation (Optimisation du gain) (figure 10).

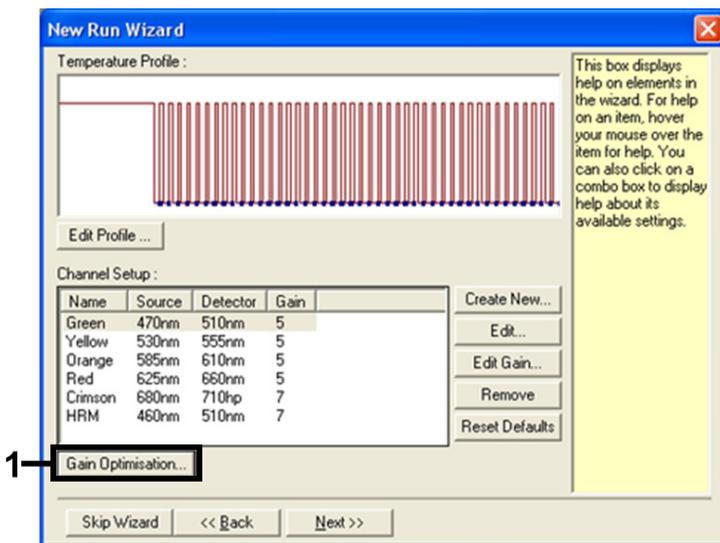


Figure 10. Gain Optimization (Optimisation du gain).

13. Cliquer sur Optimise Acquiring (Optimiser l'acquisition). Les paramètres de chaque canal sont affichés. Cliquer sur OK pour accepter ces valeurs par défaut pour les deux canaux. (figure 11).

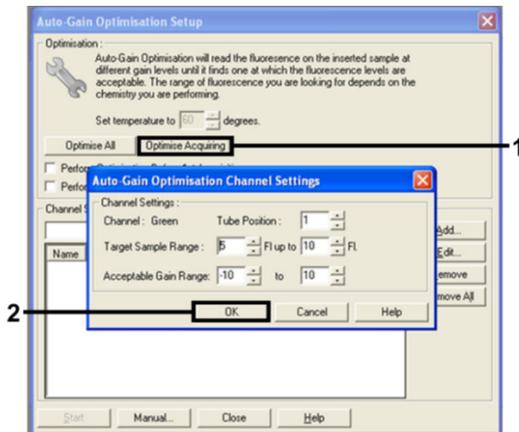


Figure 11. Auto-gain Optimization (Optimisation du gain automatique) pour le canal vert.

14. Cocher la case Perform Optimisation before 1st Acquisition (Effectuer l'optimisation avant la 1^{re} acquisition), puis cliquer sur Close (Fermer) pour revenir à l'assistant (figure 12).

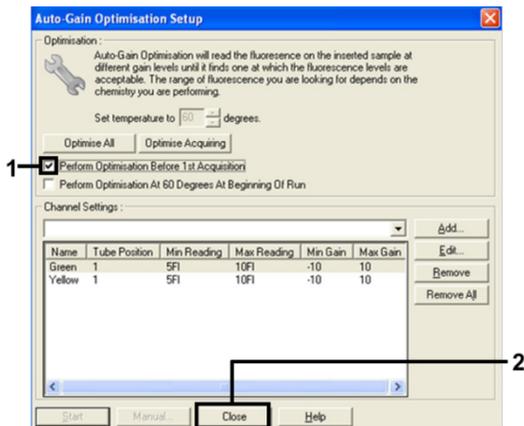


Figure 12. Sélection des canaux vert et jaune.

15. Cliquer sur Next (Suivant) pour enregistrer le modèle dans un emplacement approprié en sélectionnant Save Template (Enregistrer le modèle).

Analyse des données d'évaluation des mutations

Une fois le cycle terminé, analyser les données conformément à la procédure suivante.

Configuration de l'analyse du logiciel

1. Ouvrir le fichier approprié à l'aide du logiciel Rotor-Gene Q Series version 2.3.5 ou supérieure.
2. Si les échantillons n'ont pas été nommés avant le cycle, cliquer sur Edit Samples (Modifier les échantillons).
3. Entrer le nom des échantillons dans la colonne Name (Nom).
Remarque : les noms des puits vides doivent rester vierges.
4. Cliquer sur Analysis (Analyse). Sur la page d'analyse, cliquer sur Cycling A Yellow (Cycle A jaune) pour vérifier le canal HEX.
5. Vérifier que l'option Dynamic Tube (Tube dynamique) est mise en surbrillance. Cliquer sur Slope Correct (Correction de la pente) et Linear Scale (Échelle linéaire).
6. Cliquer sur Take Off Adj. (Définition du cycle de quantification) et entrer 15,01 et 20,01 comme indiqué dans la figure 13.

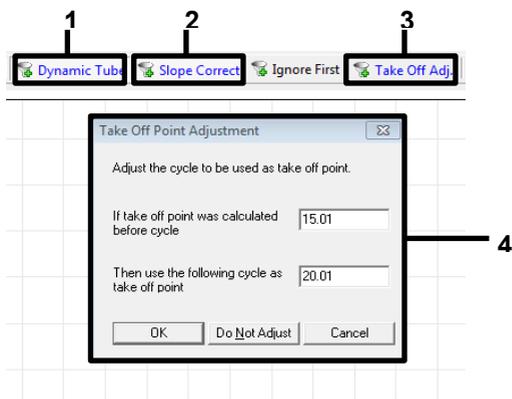


Figure 13. Paramètres de normalisation de l'analyse pour EGFR. 1 = « Dynamic Tube » (Tube dynamique), 2 = « Slope Correct » (Correction de la pente), 3 = « Take Off Adj » (Ajustement du cycle), 4 = boîte de dialogue « Take Off Adj » (Définition du cycle de quantification) avec les valeurs des paramètres.

7. Attribuer au seuil une valeur de 0,02 et vérifier les valeurs de C_T HEX.
8. Sur la page d'analyse, cliquer sur Cycling A, Green (Cycle A, vert) pour afficher le canal FAM. Définir les paramètres comme indiqué dans la figure 13 ci-dessus.
Le tube dynamique doit être mis en surbrillance.
9. Cliquer sur Slope Correct (Correction de la pente) et Linear Scale (Échelle linéaire).
10. Attribuer au seuil une valeur de 0,075 et vérifier les valeurs de C_T FAM.

Analyse des contrôles de cycles

Une fois le cycle terminé, analyser les données de la manière suivante.

- **Negative control (Contrôle négatif)** : pour garantir l'absence de contamination de la matrice, le NTC ne doit pas générer une valeur de C_T inférieure à 40 sur le canal Green (FAM). Pour garantir le bon paramétrage du cycle, le NTC doit présenter une amplification de 29,85 à 35,84 sur le canal jaune (HEX) (contrôle interne).
S'il y a une amplification positive sur le canal vert et/ou une amplification hors de l'intervalle 29,85–35,84 sur le canal jaune, le cycle n'est pas valide.
- **Positive control (Contrôle positif)** : le contrôle positif (Positive Control, PC) EGFR doit présenter pour chaque mélange réactionnel une valeur de C_T comprise dans l'intervalle (valeurs minimale et maximale incluses) indiqué dans le tableau 5. Un cycle comportant une valeur de contrôle positif en dehors de cet intervalle indique un problème de paramétrage du dosage et doit être rapporté comme ayant échoué. Si le contrôle positif présente une valeur de C_T comprise dans l'intervalle (FAM) mais que le contrôle interne présente une valeur de C_T (HEX) en dehors de l'intervalle 29,85–35,84, poursuivre l'analyse.
Remarque : les données des échantillons ne doivent pas être utilisées en cas d'échec d'un contrôle positif ou négatif.

Tableau 5. Intervalle de valeurs de C_t acceptables pour les contrôles de cycles

Contrôle réactionnel	Dosage	Canal	Intervalle de C _t
Contrôle positif	Contrôle	Green (FAM)	28,13-34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22-34,98
	Délétions	Green (FAM)	28,90-34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97-34,81
Contrôle sans matrice	Les quatre mélanges réactionnels	Green (FAM)	≥40,00
	Les quatre mélanges réactionnels	Yellow (HEX)	29,85-35,84

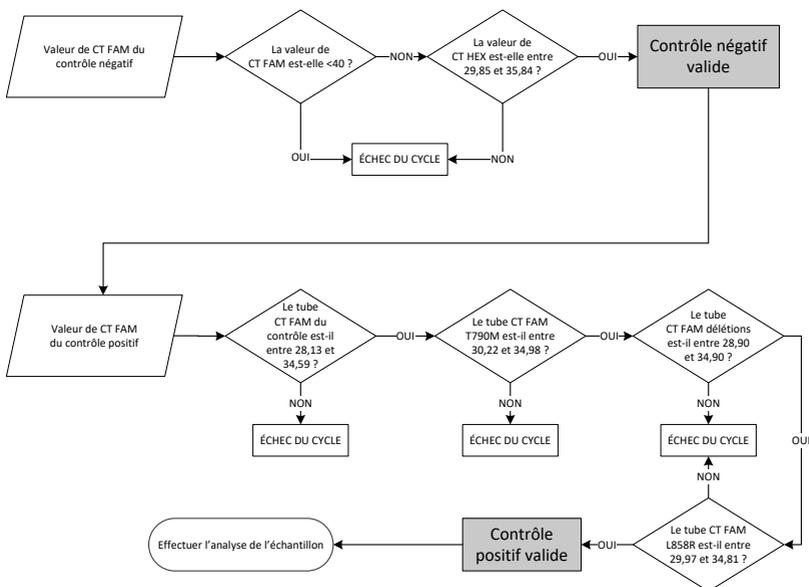


Figure 14. Organigramme d'analyse des contrôles de cycles.

Sous réserve que les deux contrôles de cycles soient valides, chaque valeur de CT des dosages de contrôle doit être comprise dans l'intervalle 23,70–31,10 sur le canal vert (FAM) (tableau 6).

Tableau 6. Intervalle de valeurs de C_T FAM acceptables pour la réaction de contrôle d'échantillons

Mélange réactionnel	Canal	Intervalle C_T acceptable
Contrôle	Green (FAM)	23,70–31,10

Si l'échantillon se trouve en dehors de cet intervalle, se conformer aux indications suivantes.

- C_T de dosage de contrôle d'échantillons inférieure à 23,70 : les échantillons avec une valeur de C_T de contrôle inférieure à 23,70 surchargent les dosages de mutation et doivent être dilués. Pour détecter chaque mutation en faible concentration, les échantillons surconcentrés doivent être dilués afin d'être compris dans l'intervalle susmentionné, sachant qu'une dilution de moitié augmente la valeur de C_T de 1.

- C_T de dosage de contrôle d'échantillon supérieur à 31,10 : l'échantillon ne contient pas suffisamment d'ADN pour permettre l'analyse.

Sous réserve que les deux contrôles de cycles soient valides et que le dosage de contrôle soit compris dans l'intervalle indiqué dans le tableau 6, chaque valeur de C_T des mutations d'échantillons doit appartenir à l'intervalle indiqué dans le tableau 7 sur le canal vert (FAM). Si l'échantillon se trouve en dehors de cet intervalle, se conformer aux indications suivantes.

Tableau 7. Valeurs de réaction de mutations d'échantillons acceptables

Réaction	Mélange réactionnel	Canal	Intervalle de C_T
Réaction de mutation	T790M	Green (FAM)	0,00-40,00
	Délétions	Green (FAM)	0,00-40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00-40,00
	Les trois mutations	Yellow (HEX)	29,85-35,84

Remarque : si un échantillon ne génère pas de C_T (c'est-à-dire $C_T > 40$), cela peut être dû à la présence d'un inhibiteur, à une erreur dans la configuration du dosage ou à l'absence d'ADN d'EGFR amplifiable.

- La valeur du contrôle interne de C_T se situe dans l'intervalle 29,85–35,84 : il n'y a pas d'ADN d'EGFR amplifiable.
- La valeur de C_T du contrôle interne ne se situe pas dans l'intervalle 29,85–35,84 : cela peut indiquer une erreur dans la configuration du dosage ou la présence d'un inhibiteur. Il est possible de réduire l'effet d'un inhibiteur en diluant l'échantillon, mais cela entraîne aussi la dilution de l'ADN.

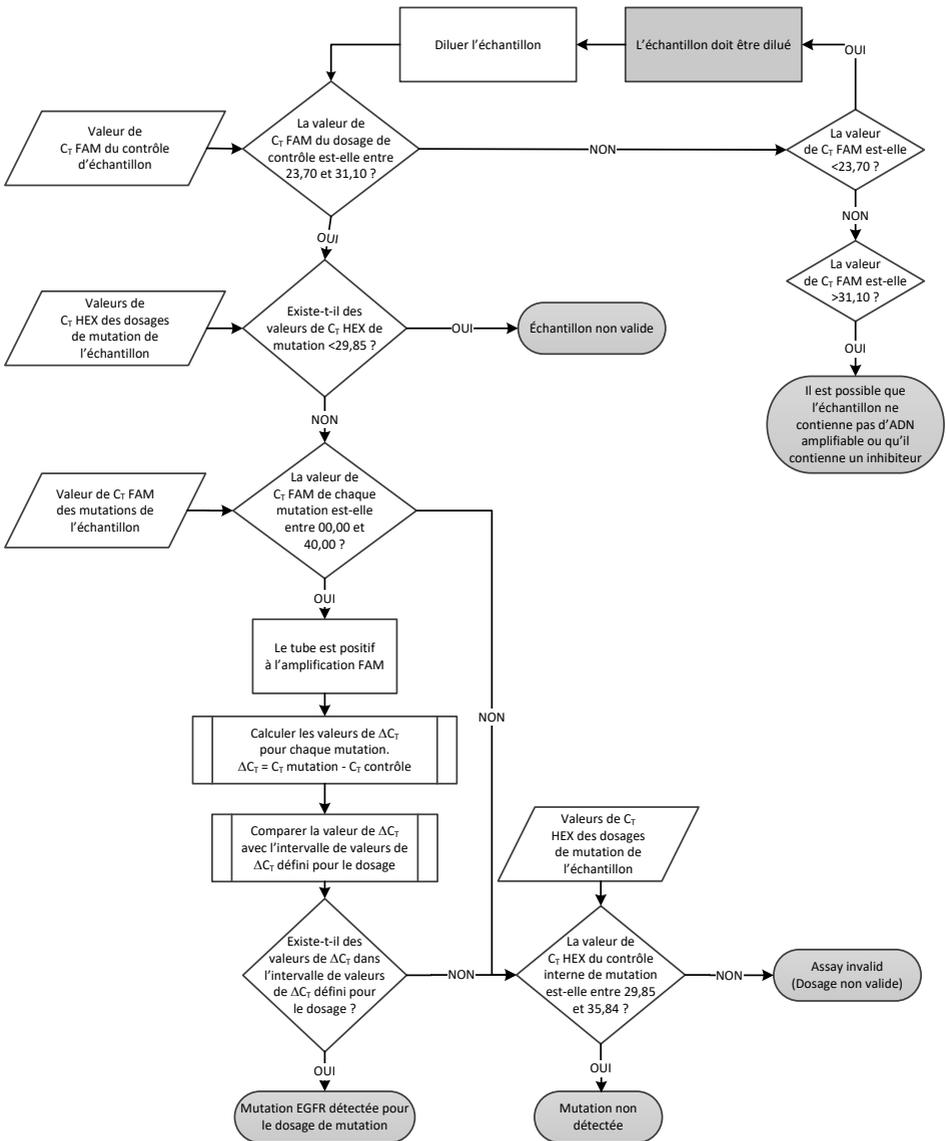


Figure 15. Organigramme d'analyse des mutations.

Valeur de C_T FAM pour les dosages de mutations d'échantillons

Les valeurs de FAM pour les trois mélanges réactionnels de mutation doivent être vérifiées par rapport aux valeurs indiquées dans le tableau 8.

Calculer la valeur seuil de ΔC_T de chaque échantillon de mutation présentant une amplification positive de la manière suivante, en veillant à ce que les valeurs de C_T des contrôles et des mutations proviennent du même échantillon.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutation} - C_T \text{ de contrôle}$$

Comparer la valeur de ΔC_T de l'échantillon avec la plage seuil de ΔC_T du dosage en question (tableau 8), en s'assurant que le point seuil correct est appliqué à chaque dosage.

Tableau 8. Plage seuil ΔC_T du dosage de mutation

Dosage de mutation	Plage seuil ΔC_T
T790M	-10,00 à 7,40
Délétions	-10,00 à 8,00
L858R	-10,00 à 8,90

La limite supérieure de la plage seuil ΔC_T est le point au-dessus duquel un signal positif peut potentiellement provenir du signal de fond de l'amorce ARMS sur l'ADN de type sauvage. Si la valeur de ΔC_T de l'échantillon est supérieure au point supérieur de la plage seuil ΔC_T , elle est classée comme « Mutation not detected » (Mutation non détectée) ou hors des limites de détection du kit. Si la valeur de l'échantillon est entre les points seuils ΔC_T , l'échantillon est considéré comme positif pour une mutation détectée par ce dosage. Si la valeur de l'échantillon est inférieure à la limite inférieure de la plage seuil ΔC_T , cela pourrait être dû à un artefact de fluorescence.

Remarque : pour les échantillons ne présentant aucune valeur de C_T de mutation FAM, il est nécessaire d'évaluer la valeur de C_T du contrôle interne (HEX) pour déterminer si la mutation

n'est pas détectée ou si le dosage est non valide. Si la valeur de C_T HEX est comprise entre 29,85 et 35,84, la mutation n'est pas détectée. Si la valeur seuil de ΔC_T HEX est en dehors de cet intervalle, l'échantillon n'est pas valide.

En résumé, pour chaque échantillon, un état de mutation détectée, mutation non détectée ou mutation non valide est attribué à chaque réaction de mutation à l'aide des critères suivants.

- Mutation détectée : une amplification FAM positive et la valeur de ΔC_T se situe dans la plage seuil ΔC_T . Si plusieurs mutations sont détectées, elles peuvent toutes être rapportées.
- Mutation non détectée :
 - une amplification FAM positive et la valeur seuil de ΔC_T est supérieure à la plage seuil ΔC_T et HEX (contrôle interne) se situe dans l'intervalle 29,85–35,84.
 - Amplification FAM négative et HEX (contrôle interne) dans l'intervalle 29,85–35,84.
- Non valide : amplification FAM négative et amplification HEX hors des intervalles spécifiés.
 - Le ΔC_T calculé est inférieur à la plage seuil ΔC_T et HEX (contrôle interne) est dans la plage attendue. Une valeur ΔC_T inférieure à -10,00 indique qu'un artefact de fluorescence peut s'être produit.

Guide de résolution de problèmes

Ce guide de résolution de problèmes peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour de plus amples informations, consulter également la page de la Foire Aux Questions dans notre Centre d'assistance technique à l'adresse suivante : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des services techniques QIAGEN seront ravis de répondre à toutes vos questions sur les informations et les protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et de dosages (pour les coordonnées, voir la quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

Aucun signal avec le contrôle positif (Positive Control, PC) EGFR sur le canal de fluorescence Cycling Green

- | | |
|---|---|
| a) Le canal de fluorescence sélectionné pour l'analyse des données de PCR ne respecte pas le protocole. | Pour l'analyse des données, sélectionner le canal de fluorescence Cycling Green pour la PCR analytique d'EGFR et le canal de fluorescence Cycling Yellow pour la PCR du contrôle interne. |
| b) Programmation incorrecte du profil de température sur l'appareil Rotor Gene Q MDx 5plex HRM | Comparer le profil de température avec le protocole et répéter l'analyse s'il est incorrect. |
| c) Mauvaise configuration de la PCR | Vérifier les étapes de la procédure à l'aide du schéma de pipetage et recommencer la PCR si nécessaire. |
| d) Les conditions de stockage d'un ou plusieurs composants du kit ne respectaient pas les instructions fournies dans la section « Conservation et manipulation des réactifs » (page 14) | Vérifier les conditions de stockage et la date d'expiration (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit si nécessaire. |
| e) Le <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit a expiré | Vérifier les conditions de stockage et la date d'expiration (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit si nécessaire. |

Commentaires et suggestions

Signaux avec les contrôles négatifs sur le canal de fluorescence et Cycling Green de la PCR analytique

- | | |
|--|--|
| a) Une contamination s'est produite lors de la préparation de la PCR | Répéter la PCR avec de nouveaux réactifs en répliquats.
Fermer les tubes de PCR juste après l'ajout de l'échantillon à tester si possible.
Veiller à ce que le plan de travail et les appareils soient décontaminés à intervalles réguliers. |
|--|--|

Plusieurs passages de seuil ou valeur de ΔC_T inférieure à la plage seuil

- | | |
|---|---|
| a) Mélange incorrect pendant la configuration du dosage | Répéter la PCR si cela affecte un contrôle ou retester l'échantillon faux.
Suivre le Mode d'emploi en faisant attention aux étapes de mélange. |
|---|---|

Contrôle de la qualité

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

Limitations

Les résultats obtenus avec le produit doivent être interprétés en tenant compte de tout autre résultat clinique ou de laboratoire approprié et ne doivent pas être utilisés seuls pour établir le diagnostic.

Ce produit est réservé au personnel ayant reçu les instructions et la formation appropriées pour les procédures de diagnostic *in vitro* et l'utilisation de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Les études de validation analytique ont inclus de l'ADN humain extrait d'échantillons de plasma.

Ce produit est destiné à être utilisé uniquement sur un thermocycleur de *real-time* PCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Il est nécessaire de se conformer strictement au *manuel theascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* pour obtenir les meilleurs résultats possible. Il n'est pas recommandé de diluer les réactifs d'une autre manière que celle décrite dans ce manuel, car cela entraîne une baisse des performances.

Prêter attention aux dates de péremption et aux conditions de stockage imprimées sur l'emballage et les étiquettes des composants. Ne pas utiliser de composants périmés ou stockés dans de mauvaises conditions.

Les amorces dans le mélange réactionnel pour délétions d'EGFR ont été conçues pour cibler plusieurs délétions dans l'exon 19, couvrant les nucléotides 55 174 772 à 55 174 795 (GRCh38 chr7), pour une portée de 23 pb.

Bien que le dosage de délétions dans l'exon 19 ait été validé analytiquement et que sa capacité à détecter les délétions spécifiées dans l'exon 19 ait été démontrée (voir le tableau 13 dans ce manuel), il est possible que d'autres mutations (y compris, mais sans s'y limiter, des délétions supplémentaires dans l'exon 19, des insertions dans l'exon 19 et la mutation L747P) soient amplifiées par le mélange réactionnel pour délétions.

Si elles sont présentes, de telles mutations supplémentaires entraînent un résultat « Deletions Detected » (Délétions détectées) pour un échantillon patient donné.

En outre, il est possible que la mutation L858Q soit détectée par le mélange réactionnel pour L858R. Par conséquent, si elle est présente chez un patient, la mutation L858Q peut entraîner un résultat « L858R Mutation Detected » (Mutation L858R détectée).

Caractéristiques de performances

Sensibilité analytique : limite du blanc (limit of blank, LoB)

Pour évaluer les performances du *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit en l'absence de matrice et garantir qu'un blanc ou un échantillon d'ADN de type sauvage ne génère pas de signal pouvant indiquer une faible concentration de mutation, l'ADN d'EGFR de type sauvage de plasma CPNPC a été évalué sur 59 échantillons différents. Le critère d'acceptation pour cette étude (au moins 95 % des échantillons de type sauvage doivent présenter une valeur seuil ΔC_T supérieure au seuil respectif) est rempli.

Limite de détection (Limit of Detection, LoD)

La LoD est le pourcentage minimal d'ADN mutant pouvant être détecté dans un fond d'ADN de type sauvage lorsque l'ADN amplifiable total (à l'intérieur de la plage de quantité introduite) a entraîné des détections de mutation correctes dans 95 % des cas pour chaque échantillon présentant une mutation positive (C95). La plage de validité de la quantité d'ADN introduit pour le dosage est définie par la valeur de C_T du contrôle à l'intervalle 23,70–31,10 susmentionné.

La LoD a été déterminée pour une faible quantité d'ADN introduit (C_T du contrôle d'environ 30,10) à l'aide d'ADN dérivé de tissu FFPE pour le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. La LoD a été déterminée à l'aide de prélèvements cliniques FFPE et de lignées cellulaires FFPE avec de faibles quantités d'ADN introduit pour ces mutations d'EGFR.

Les valeurs de LoD établies à l'aide de tissu FFPE ont été vérifiées pour le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit avec de l'ADN dérivé d'échantillons de plasma positifs mutants artificiels.

Les revendications finales de LoD données dans le tableau 9 ci-après indiquent le pourcentage de mutation ayant donné une probabilité prévue de détections correctes de 95 % pour chacune des mutations.

Tableau 9. LoD pour chacun des dosages de mutations d'EGFR

Exon	Mutation	ID COSMIC*	Revendication de LoD en %
20	T790M	6240	17,5*
		6223	6,4*
		13551	4,24*
		12728	2,43 [†]
		12419	16,87 [†]
		12422	3,24 [†]
		6218	9,83 [†]
		6210	7,44 [†]
		6254	10,2*
		12370	8,1*
19	Délétions	12678	10,40 [†]
		12367	4,39 [†]
		12384	7,54 [†]
		6225	6,5*
		6220	2,7*
		6255	0,81*
		12382	1,45*
		12383	4,58*
21	L858R	6224	5,94*

* Revendications de LoD vérifiées dans le plasma dans le cadre de l'étude de confirmation de la LoD du *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

[†] Ces mutations n'ont pas été confirmées dans le plasma.

Sensibilité analytique — seuils ΔC_T et plage seuil ΔC_T

Une approche fondée sur l'analyse des risques a été adoptée en ce qui concerne les taux de faux positifs lors de la définition des seuils de dosage et les valeurs de LoB estimées ont été utilisées comme une composante dans l'établissement des valeurs seuils.

Les plages seuil ΔC_T respectives établies pour chaque dosage de mutation dans le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit sont indiquées dans le tableau 10.

Tableau 10. Plages seuils de ΔC_T seuils du *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit

Dosage de mutation	Plage seuil ΔC_T
T790M	-10,00 à 7,40
Délétion	-10,00 à 8,00
L858R	-10,00 à 8,90

Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées en testant un niveau de mutation de $3 \times \text{LoD}$ dans un fond d'ADN génomique de type sauvage sur 3 sites de tests, à l'aide de plusieurs lots de kit, en faisant intervenir plusieurs opérateurs et en effectuant des tests sur plusieurs jours, avec 2 réplicats de chaque échantillon. Pour chacun des 3 dosages de mutation, 100 % des échantillons d'ADN mutant ont présenté un résultat de mutation positif. Les échantillons de type sauvage ont donné un résultat de mutation négatif dans tous les dosages et sur tous les sites.

Effet de la quantité d'ADN introduit sur les valeurs de C_T

La quantité d'ADN introduit est définie comme la quantité totale d'ADN d'EGFR amplifiable dans un échantillon, telle que déterminée par les valeurs de C_T de la réaction de contrôle. Pour démontrer que les performances du *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit sont constantes sur tout l'intervalle de valeurs de C_T de la réaction de contrôle (23,70–31,10), les 3 dosages de mutations d'EGFR ont été évalués par rapport à une série de dilution 1:3 à six points (ADN

extrait de lignées cellulaires FFPE). La valeur de C_T cible pour la dilution 1 était d'environ 24,70 pour chaque mutation. La dilution finale, qui a donné une valeur de C_T d'environ 32 à 33, était en dehors de l'intervalle de valeurs de C_T de la réaction de contrôle. Les valeurs seuil de ΔC_T mesurées pour différentes quantités totales d'ADN introduit étaient généralement cohérentes sur la plage de validité du *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Substances interférentes

Substances interférentes endogènes

Les substances potentiellement interférentes ont été dopées dans des échantillons de plasma positifs mutants artificiels à $3 \times \text{LoD}$. Les échantillons ont ensuite été testés avec le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Les échantillons contenant les substances potentiellement interférentes ont été comparés aux échantillons de plasma positifs mutants artificiels à $3 \times \text{LoD}$ ne contenant aucune substance interférente dopée. Chaque substance interférente a été testée avec 4 réplicats.

Une différence supérieure à 2 écarts-types (ÉT) (tiré de l'étude de précision) entre la valeur de ΔC_T du « test » et celle du « contrôle » (aucune substance interférente) a été interprétée comme indiquant une interférence potentielle. Dans de tels cas, la différence observée dans la valeur de ΔC_T est fournie.

Les concentrations des tests fournies dans le tableau 11 ont été sélectionnées en fonction des recommandations du document EP07-A2 du CLSI. Elles sont représentatives des concentrations maximales susceptibles d'être observées dans un échantillon clinique.

Remarque : ces composés endogènes ont été dopés dans des échantillons de plasma positifs mutants artificiels comprenant du plasma de donneurs sains. Par conséquent, ces composés endogènes auraient été naturellement présents dans les échantillons à des concentrations inconnues avant le dopage. La concentration finale de chaque substance endogène potentiellement interférente testée serait probablement supérieure à la concentration du test.

Tableau 11. Substances endogènes potentiellement interférentes

Substances potentiellement interférentes (IS)	Concentration du test
Bilirubine non conjuguée	15 mg/dl
Hémoglobine (humaine)	0,2 g/dl
Triglycérides	3 g/dl

Dosage T790M

Il a été démontré que les composés endogènes suivants aux concentrations indiquées dans le tableau 11 ont un effet supérieur à $2 \times \text{ÉT}$ ($0,40 \Delta C_T$) sur les performances du dosage de T790M :

- Triglycérides, différence de $1,37 \Delta C_T$

Dosage de délétions

Il a été démontré que les composés endogènes suivants aux concentrations indiquées dans le tableau 11 ont un effet supérieur à $2 \times \text{ÉT}$ ($0,71 \Delta C_T$) sur les performances du dosage de délétions :

- Hémoglobine, différence de $0,80 \Delta C_T$

Dosage L858R

Il a été démontré que les composés endogènes suivants aux concentrations indiquées dans le tableau 11 ont un effet supérieur à $2 \times \text{ÉT}$ ($0,56 \Delta C_T$) sur les performances du dosage de L858R :

- Bilirubine, différence de $1,13 \Delta C_T$
- Triglycérides, différence de $1,53 \Delta C_T$

Substances interférentes exogènes

Les substances potentiellement interférentes ont été dopées dans des échantillons de plasma positifs mutants artificiels à $3 \times \text{LoD}$. Les échantillons ont ensuite été testés avec le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Les échantillons contenant les substances potentiellement interférentes ont été comparés aux échantillons de plasma positifs mutants artificiels à $3 \times \text{LoD}$ ne contenant aucune substance interférente dopée. Chaque substance interférente a été testée avec 4 réplicats.

Une différence supérieure à 2 écarts-types (tirés de l'étude de précision) entre la valeur de ΔC_T du « test » et celle du « contrôle » (aucune substance interférente) a été interprétée comme indiquant une interférence potentielle. Dans de tels cas, la différence observée dans la valeur de ΔC_T est fournie.

Les concentrations des tests fournies dans le tableau 12 ont été sélectionnées en fonction des recommandations du document EP07-A2 du CLSI. Elles dépassent la concentration thérapeutique dans tous les cas.

Tableau 12. Substances endogènes potentiellement interférentes

Substance potentiellement interférente	Concentration du test ($\mu\text{g/ml}$)
Bromhydrate de citalopram	0,75
Chlorhydrate hémihydrate de paroxétine	1,14
Chlorhydrate de sertraline	0,67
Chlorhydrate de fluoxétine	3,87
Acétaminophène	200,7
K ₂ EDTA	3600

Dosage T790M

Il a été démontré que les composés exogènes suivants aux concentrations indiquées dans le tableau 12 ont un effet supérieur à $2 \times \text{ÉT}$ ($0,40 \Delta C_T$) sur les performances du dosage de T790M :

- Bromhydrate de citalopram, différence de $0,52 \Delta C_T$
- Chlorhydrate de sertraline, différence de $0,47 \Delta C_T$
- Chlorhydrate de fluoxétine, différence de $0,48 \Delta C_T$

Dosage de délétions

Il a été démontré que les composés exogènes suivants aux concentrations indiquées dans le tableau 12 ont un effet supérieur à $2 \times \text{ÉT}$ ($0,71 \Delta C_T$) sur les performances du dosage de délétions :

- Fluoxétine, différence de $0,73 \Delta C_T$

Dosage L858R

Il a été démontré que les composés exogènes suivants aux concentrations indiquées dans le tableau 12 ont un effet supérieur à $2 \times \text{ÉT}$ ($0,56 \Delta C_T$) sur les performances du dosage de L858R :

- Bromhydrate de citalopram, différence de $0,72 \Delta C_T$
- Chlorhydrate hémihydrate de paroxétine, différence de $0,92 \Delta C_T$
- Chlorhydrate de sertraline, différence de $0,82 \Delta C_T$
- Chlorhydrate de fluoxétine, différence de $0,98 \Delta C_T$
- Acétaminophène, différence de $0,81 \Delta C_T$
- K_2 EDTA, différence de $0,57 \Delta C_T$

Performances cliniques

L'essai clinique NCT01203917 était une étude ouverte à un seul bras de phase IV destinée à évaluer l'efficacité et la tolérance du géfitinib en première intention chez les patients caucasiens avec CPNPC de phase IIIA/B/IV positif à une mutation d'EGFR.

L'éligibilité des patients à l'essai clinique NCT01203917 a été déterminée en fonction de la présence de mutations d'EGFR sensibilisantes. L'état mutationnel du gène EGFR des patients avec CPNPC a été évalué à l'aide du dosage d'étude clinique (Clinical Trial Assay, CTA) et avec de l'ADN provenant d'échantillons de tissu et de plasma correspondants. L'étude comprenait un objectif de biomarqueur exploratoire déjà planifié en vue de déterminer si les échantillons de plasma pouvaient être considérés pour l'analyse des mutations en cas d'indisponibilité d'échantillons de tissu. Les résultats ont démontré des taux de concordance élevés à 94,3 % entre les échantillons de tissu et de plasma correspondants, avec une spécificité de 99,8 % et une sensibilité de 65,7 % pour le dosage.

Des tests rétrospectifs de prélèvements de plasma issus de patients dépistés pour l'essai clinique NCT01203917 ont été effectués à l'aide du *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Une étude de transition a été réalisée afin d'évaluer la concordance du *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit avec le CTA utilisé pour sélectionner les patients admis à l'essai clinique NCT01203917. L'équivalence entre le CTA et le *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit a été établie.

Références

1. Douillard, J.Y., et al. (2014). First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* 110(1), 55.
2. Walsh, K., et. al. (2014) A cautionary lesson on the use of targeted methods for EGFR mutation analysis; a case report. *J. Clin. Pathol.* 67, 734
3. Huang, J., Wang, Y., Zhai, Y., and Wang, J. (2018) Non-small cell lung cancer harboring a rare EGFR L747P mutation showing intrinsic resistance to both gefinitib and osimertinib (AZD9291): A case report. *Thorac. Cancer.* 9, 745

Coordonnées

Pour bénéficier d'une assistance technique et obtenir plus d'informations, consultez notre Centre d'assistance technique à l'adresse www.qiagen.com/Support, appelez le 00800-22-44-6000 ou contactez l'un des Services techniques QIAGEN ou l'un de ses distributeurs locaux (voir la quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Symboles

Les symboles suivants peuvent figurer dans le mode d'emploi ou sur l'emballage et les étiquettes :

Symbole	Définition du symbole
 Σ <N>	Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions
	À utiliser avant
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Numéro de matériel (c.-à-d. étiquette de composant)
	Composants
	Contient
	Numéro
	Numéro d'article du commerce global
Rn	R désigne une révision du mode d'emploi et n représente le numéro de révision
	Limites de température
	Fabricant

Symbole

Définition du symbole



Consulter le mode d'emploi



Avertissement/mise en garde

Annexe A : informations sur les mutations

Le tableau 13 présente les identifiants COSMIC tirés du Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catalogue des mutations somatiques associées au cancer, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Tableau 13. Liste des mutations et des identifiants COSMIC

Mutation	Exon	Changement de base	ID COSMIC
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
		2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (complexe)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (complexe)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (complexe)	12422
Délétions	19	2238_2252>GCA (complexe)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (complexe)	12382
		2239_2258>CA (complexe)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (complexe)	12383

Pour commander

Produit	Sommaire	N° de réf.
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit – pour la détection des mutations dans le gène EGFR		
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	Pour 24 réactions : 1 dosage de contrôle, 7 dosages de mutations, contrôle positif, <i>Taq</i> ADN polymérase	870311
Rotor-Gene Q MDx et accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Thermocycleur de real-time PCR et analyseur de fusion à haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1-an pièces et main-d'œuvre, installation et formation non comprises	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Thermocycleur pour real-time PCR et analyseur « High Resolution Melt » (fusion haute résolution) à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : garantie 1 an pièces, main d'œuvre, installation et formation comprises	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloc en aluminium pour préparation manuelle des réactions à l'aide d'une pipette monocanal dans 72 tubes de 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 barrettes de 4 tubes et bouchons pour 1000 réactions	981103

Produit	Sommaire	N° de réf.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 barrettes de 4 tubes et bouchons pour 10 000 réactions	981106
Produits associés		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Pour 50 préparations : colonnes QIAamp Mini, extensions de tubes (20 ml), QIAGEN Proteinase K, ARN vecteur, tampons, VacConnectors et Collection Tubes (1,5 ml et 2 ml)	55114

Pour connaître les dernières informations sur les licences et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consultez le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Historique des révisions du document

Révision

Description

R4, octobre 2019

Modification du fabricant légal (**première de couverture**)
Adaptation du nom de l'appareil Rotor-Gene Q MDx en Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM pour le faire correspondre à l'étiquette sur l'appareil
Correction des instructions de stockage des réactifs de 90 jours à 12 mois ou jusqu'à la date de péremption.
Réactualisation de la section « Limites » avec les informations sur le dosage des délétions dans l'exon 19 et le dosage de L858R
Révision du tableau 9 pour remplacer la mutation L858R dupliquée de l'exon 21 par les délétions dans l'exon 19
Suppression du symbole EC + REP sur la première de couverture et dans la section des symboles

R5, juin 2020

Mise à jour des références à la version du logiciel RGQ de 2.3 à 2.3.5 ou supérieure
Mise à jour des tableaux 8 et 10 pour appliquer la nouvelle plage seuil ΔC_T et ajustement de toutes les descriptions pertinentes conformément au manuel complet
Mise à jour de tous les chapitres du protocole pour inclure les informations relatives à l'importance du mélange dans les sections Points importants avant de commencer ; mise en évidence des détails de mélange à toutes les étapes du mélange
Ajout d'une étape de mélange à la section « Protocole : détection des mutations d'EGFR »
Mise à jour de la section Dépannage pour ajouter une solution aux passages de seuils multiples

R6, juin 2022

Mise à jour du tableau dans la section Substances interférentes pour réviser la concentration du test pour la Bilirubine non conjuguée de 150 à 15 mg/dbl

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Contrat de licence limitée pour le *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit

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

1. Le produit doit être utilisé uniquement avec les composants du panel, conformément aux protocoles fournis avec le produit et à ce manuel. 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 tenue pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences 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 toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres 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 ce Contrat 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 Contrat 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.

Marques de commerce : QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], *therascreen*[®], Rotor-Gene[®], Scorpions[®] (groupe QIAGEN) ; FAM[™], HEX[™] (Thermo Fisher Scientific Inc.) ; IRESSA[®] (groupe AstraZeneca). Les noms déposés, marques commerciales, etc. cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

Juin-2022 HB-1898-007 1127512FR © 2022 QIAGEN, tous droits réservés.

