

# Manuel du kit *therascreen*<sup>®</sup> EGFR RGQ PCR

Version 1

Σ 24

**IVD**

Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*

Pour utilisation avec l'instrument Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM



**REF** 870111



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street

North, Manchester, M15 6SH, Royaume-Uni

**R4** **MAT** 1063321FR



# Technologies d'échantillonnage et de dosage QIAGEN

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillonnage et de dosage permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services avancés de haute qualité garantissent le succès, de l'échantillon jusqu'au résultat.

## **QIAGEN fixe les normes en matière de :**

- purification d'ADN, d'ARN et de protéines
- dosages d'acides nucléiques et de protéines
- recherche micro-ARN et ARNi
- automatisation des technologies d'échantillonnage et de dosage

Notre mission consiste à permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Contenu

<b>Utilisation prévue</b>	<b>5</b>
<b>Résumé et explication</b>	<b>5</b>
<b>Principe de la procédure</b>	<b>6</b>
<b>Matériel fourni</b>	<b>9</b>
Contenu du kit	9
<b>Matériel nécessaire mais non fourni</b>	<b>10</b>
<b>Avertissements et précautions</b>	<b>11</b>
Informations de sécurité	11
Précautions générales	11
<b>Stockage et manipulation des réactifs</b>	<b>12</b>
<b>Stockage et manipulation des prélèvements</b>	<b>13</b>
<b>Procédure</b>	<b>13</b>
Détermination du niveau de cellules tumorales requis pour l'analyse d'EGFR13	
Isolement d'ADN	14
Protocoles	
■ Evaluation de l'échantillon	15
■ Détection des mutations EGFR	18
■ Configuration du Rotor-Gene Q EGFR	22
<b>Interprétation des résultats</b>	<b>32</b>
Analyse des données d'évaluation de l'échantillon	32
Analyse des données de mutation EGFR	36
Guide de dépannage	47
<b>Contrôle qualité</b>	<b>48</b>
<b>Limitations</b>	<b>48</b>
<b>Caractéristiques des performances</b>	<b>49</b>
Seuils	49
Limite de détection (LoD)	49
Précision	50
Reproductibilité	51
Effet de la concentration d'ADN d'entrée	51
Substances interférentes	52

<b>Références</b>	<b>52</b>
<b>Symboles</b>	<b>53</b>
<b>Coordonnées</b>	<b>53</b>
<b>Annexe : informations concernant la mutation</b>	<b>54</b>
<b>Pour commander</b>	<b>56</b>

## Utilisation prévue

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR est un test de diagnostic *in vitro* destiné à détecter 29 mutations somatiques de l'oncogène EGFR et à fournir une évaluation qualitative de l'état mutationnel.

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR doit être utilisé par un personnel formé, dans un environnement professionnel de laboratoire, avec des échantillons d'ADN extraits de tissu de cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) fixé au formaldéhyde et inclus en paraffine. Les résultats doivent aider le clinicien à identifier les patients atteints de CPNPC pouvant bénéficier d'un traitement à base d'inhibiteurs de tyrosine-kinase.

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR est destiné à une utilisation pour le diagnostic *in vitro*.

## Résumé et explication

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR est un kit prêt à l'emploi utilisé pour détecter 29 mutations somatiques de l'oncogène EGFR à l'aide de la technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR) sur l'instrument Rotor-Gene Q.

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

- 19 délétions dans l'exon 19 (détecte la présence de l'une quelconque des 19 délétions sans distinction entre celles-ci)
- T790M
- L858R
- L861Q
- G719X (détecte la présence de G719S, G719A ou G719C sans distinction entre celles-ci)
- S768I
- 3 insertions dans l'exon 20 (détecte la présence de l'une quelconque des 3 insertions sans distinction entre celles-ci)

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

# Principe de la procédure

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR utilise deux technologies (ARMS et Scorpions) pour détecter les mutations dans la PCR en temps réel.

## ARMS

L'amplification spécifique d'allèle ou de mutation s'effectue par le biais du système ARMS (système de mutation réfractaire par amplification). 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. Des séquences aux mutations spécifiques sont sélectionnées pour être amplifiées, même pour des échantillons où la majorité des séquences ne contient 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 entraînant un faible bruit de fond peut se produire.

## Scorpions

La détection de l'amplification s'effectue par le biais de la technologie Scorpions. Les Scorpions sont des molécules bi-fonctionnelles contenant une amorce de PCR qui comporte une liaison covalente avec une sonde. Le fluorophore de cette sonde interagit avec un quencher, lui aussi intégré à la sonde, ce qui diminue la fluorescence. Au cours d'une PCR, lorsque la sonde s'hybride à l'amplicon, le fluorophore et le quencher se séparent. La fluorescence du tube de réaction augmente.

## Format du kit

Huit tests sont fournis dans le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR :

- Un test témoin (Ctrl)
- Sept tests de mutation

Tous les mélanges réactionnels contiennent des réactifs destinés à détecter les cibles marquées FAM™ et un test témoin interne marqué HEX™. La présence d'inhibiteurs pouvant entraîner des faux négatifs peut ainsi être détectée par le test témoin interne. L'amplification FAM peut surpasser l'amplification par témoin 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.

## Procédure

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR comporte une procédure en deux étapes. Lors de la première étape, le test témoin est effectué afin d'évaluer l'ADN total d'un échantillon. Lors de la seconde étape, les tests témoin et de mutation sont effectués pour déterminer la présence ou non d'ADN ayant subi une mutation.

## Tests :

### Test témoin

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

Nous recommandons fortement l'utilisation du mélange réactionnel témoin (Ctrl) fourni avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR pour évaluer l'ADN total présent dans un échantillon. Ce test témoin amplifie une région d'exon 2 du gène EGFR. Nous recommandons de préparer les échantillons uniquement avec le test témoin, en utilisant le témoin positif EGFR (PC) comme témoin positif et de l'eau sans nucléase (H<sub>2</sub>O) comme témoin négatif.

**Remarque :** l'évaluation de l'ADN doit s'appuyer sur la PCR et peut différer de la quantification reposant sur des valeurs d'absorbance. Un mélange réactionnel témoin supplémentaire (Ctrl) est fourni pour évaluer la qualité et la quantité d'ADN dans les échantillons avant l'analyse avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

### Tests de mutation

Chaque test de mutation contient une sonde Scorpion marquée FAM et une amorce afin de distinguer l'ADN de type sauvage de l'ADN mutant spécifique.

### Témoins

**Remarque :** toutes les analyses de contrôle doivent inclure les témoins suivants.

#### Témoin positif

Chaque analyse doit contenir un témoin positif dans les tubes 1 à 8. Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR contient un témoin positif EGFR (PC) à utiliser en tant que matrice dans la réaction du témoin positif. Les résultats du témoin positif sont évalués pour garantir que le kit fonctionne conformément aux critères d'acceptation donnés.

#### Témoin négatif

Chaque analyse doit contenir un témoin négatif (« no template control », NTC) dans les tubes 9 à 16. Le NTC contient de l'eau sans nucléase (H<sub>2</sub>O) à utiliser en tant que « matrice » pour le témoin négatif. Le témoin négatif est utilisé pour évaluer toute contamination potentielle durant la configuration de l'analyse et pour évaluer les performances de la réaction du témoin interne.

## Évaluation de la réaction du témoin interne

Chaque mélange réactionnel contient un témoin 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 témoin interne dû à l'inhibition de la PCR, la dilution de l'échantillon peut réduire l'effet des inhibiteurs, mais il faut noter que l'ADN cible serait alors lui aussi dilué. L'amplification FAM peut surpasser l'amplification par témoin interne, de sorte que la valeur  $C_T$  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

Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR			(24)
N° de référence			870111
Nombre de réactions			24
Rouge	Control Reaction Mix (Mélange réactionnel témoin)	Ctrl	2 x 600 µL
Violet	T790M Reaction Mix (Mélange réactionnel T790M)	T790M	600 µL
Orange	Deletions Reaction Mix (Mélange réactionnel délétions)	Del	600 µL
Rose	L858R Reaction Mix (Mélange réactionnel L858R)	L858R	600 µL
Vert	L861Q Reaction Mix (Mélange réactionnel L861Q)	L861Q	600 µL
Jaune	G719X Reaction Mix (Mélange réactionnel G719X)	G719X	600 µL
Gris	S768I Reaction Mix (Mélange réactionnel S768I)	S768I	600 µL
Bleu	Insertions Reaction Mix (Mélange réactionnel insertions)	Ins	600 µL
Marron	EGFR Positive Control (Témoin positif EGFR)	PC	300 µL
Turquoise	Taq DNA Polymerase ( <i>Taq</i> ADN polymerase)	<i>Taq</i>	138 µL
Blanc	Nuclease-Free Water (Eau sans nuclease)	H <sub>2</sub> O	2 x 1,9 mL
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit Handbook (manuel en anglais)			1

## Matériel nécessaire mais non fourni

Lors de la manipulation des 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) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

- Kit d'isolement d'ADN (voir « Isolement d'ADN », page 14)
- Xylène
- Éthanol (96 – 100 %)\*
- Tubes de microcentrifugeuse de 1,5 mL ou 2 mL (pour les étapes de lyse)
- Tubes de microcentrifugeuse de 1,5 mL (pour les étapes d'élution) (disponibles chez Brinkmann [Safe-Lock, n° réf. 022363204], chez Eppendorf [Safe-Lock, n° réf. 0030 120.086], ou chez Sarstedt [Safety Cap, n° réf. 72.690])†
- Pipettes dédiées‡ (adaptables) pour la préparation des échantillons
- Pipettes dédiées‡ (adaptables) pour la préparation du master mix PCR
- Pipettes dédiées‡ (adaptables) pour la distribution de l'ADN matrice\*
- Pointes de pipette exemptes de DNase, de RNase et d'ADN avec filtres (pour éviter la contamination croisée, nous recommandons des pointes de pipette avec des filtres anti-aérosols)
- Thermomixeur, incubateur orbital chauffé, bloc chauffant ou bain-marie capable d'incuber à 90 °C‡
- Centrifuge de paillasse‡ avec rotor pour tubes de réaction de 2 mL
- Agitateur
- Instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM‡§ avec canaux de fluorescence pour Cycling Green et Cycling Yellow (pour détecter respectivement FAM et HEX)
- Logiciel Rotor-Gene Q, version 2.0.2 ou supérieure
- Barrettes de tubes et de capuchons de 0,1 mL à utiliser avec un rotor de 72 puits (n° réf. 981103 ou 981106)

\* Ne pas utiliser d'alcool dénaturé, qui contient d'autres substances, telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone.

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

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

§ Instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM, le cas échéant.

Également connu sous le nom de Rotor-Gene Q MDx dans certains pays.

- Tubes de microcentrifugeuse exempts de DNase, de RNase et d'ADN pour la préparation des master mix
- Bloc de chargement de tubes de 72 x 0,1 mL : bloc en aluminium pour préparation de réaction manuelle avec pipette à canal unique (QIAGEN, n° réf. 9018901)

## Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*

### Informations de sécurité

Lors de la manipulation des 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) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.

### Informations d'urgence 24 heures sur 24

Aide d'urgence chimique et assistance en cas d'accident disponible  
24 heures/24 auprès de :

CHEMTREC

**Aux États-Unis et au Canada** ■ Tél. : 1-800-424-9300

**Dans les autres pays** ■ Tél. : +1-703-527-3887 (appels à frais virés acceptés)

### Précautions générales

L'utilisateur doit toujours faire attention aux éléments suivants.

- Utiliser des pointes de pipette exemptes de DNase, de RNase et d'ADN avec filtres et s'assurer que les pipettes ont été calibrées conformément aux instructions du fabricant.
- Conserver et procéder à l'extraction du matériel positif (prélèvements et témoins 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 (entre 15 et 25 °C) avant de commencer un test.
- Lorsqu'ils sont décongelés, mélanger les composants en retournant 10 fois chaque tube et les passer brièvement à la centrifugeuse.

**Remarque** : faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination des PCR avec le matériel témoin synthétique. Nous recommandons d'utiliser des pipettes séparées et 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 séparée de celle de l'ajout de l'ADN matrice. Les tubes du Rotor-Gene Q ne doivent pas être ouverts une fois l'analyse PCR terminée. Cela permet d'éviter toute contamination de laboratoire avec les produits ultérieurs à la PCR.

**Remarque** : les réactifs sont validés pour une préparation manuelle. Dans le cadre d'une méthode automatique, le nombre de réactions possibles peut être diminué en raison d'un réactif censé remplir les « volumes morts » de ces instruments.

**Remarque** : tous les réactifs du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR ont été formulés pour être utilisés spécifiquement avec les tests donnés. Tous les réactifs fournis dans le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs du même kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Afin de garantir des performances optimales, les réactifs de ce kit ne doivent pas être remplacés.

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

**Remarque** : les réactifs pour le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR ont été dilués de manière optimale. Nous ne recommandons aucune dilution supplémentaire des réactifs : celle-ci pourrait entraîner une baisse des performances. L'utilisation de volumes réactionnels inférieurs à 25 µL n'est pas recommandée compte tenu du risque d'augmentation des faux négatifs.

## Stockage et manipulation des réactifs

Le contenu du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR est expédié sur un lit de carboglace et doit être congelé dès l'arrivée. Si le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR n'est pas congelé dès l'arrivée, que l'emballage extérieur a été ouvert au cours du transport, que le colis ne contient pas de notice d'emballage, de manuel ou de réactifs, prière de contacter l'un des départements d'assistance technique ou l'un des distributeurs locaux de QIAGEN (voir quatrième de couverture ou visiter le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR doit être stocké dès réception à une température comprise entre -15 °C et -25 °C dans un congélateur à température constante et à l'abri de la lumière. Le kit est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette s'il est stocké conformément aux conditions de conservation recommandées dans son emballage original. Éviter les

congélation et décongélation à répétition. Nous recommandons au maximum 7 cycles de congélation-décongélation.

**Remarque** : pour garantir une activité et des performances optimales, les molécules Scorpions (tout comme toutes les molécules marquées en fluorescence) doivent être protégées de la lumière pour éviter tout photoblanchiment.

**Remarque** : pour une utilisation optimale des réactifs du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, les échantillons doivent être regroupés par lot. Si des échantillons sont testés individuellement, plus de réactifs seront utilisés, ce qui diminue le nombre d'échantillons pouvant être testés avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

## Stockage et manipulation des prélèvements

**Remarque** : tous les échantillons doivent être traités comme des substances présentant un risque potentiel d'infection.

Les échantillons doivent être constitués d'ADN génomique humain extrait d'échantillons de tumeurs pulmonaires non à petites cellules fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE). Les prélèvements doivent être transportés conformément à la méthodologie standard de pathologie pour garantir leur bonne qualité.

Les échantillons tumoraux ne sont pas homogènes et les données d'un échantillon tumoral donné peuvent ne pas concorder avec d'autres sections de la même tumeur. Les échantillons tumoraux peuvent également contenir du tissu non tumoral. L'ADN de tissu non tumoral n'est pas censé contenir des mutations du gène EGFR détectées par le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

## Procédure

### Détermination du niveau de cellules tumorales requis pour l'analyse d'EGFR

Le tissu utilisé pour l'analyse EGFR est un tissu d'échantillons de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) fixé au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE). L'ADN extrait de cellules de ce tissu tumoral peut être de type sauvage dans le cadre des mutations de l'EGFR ou peut contenir une ou plusieurs mutations.

Le tissu CPNPC FFPE utilisé pour l'extraction peut également contenir un tissu normal non tumoral, qui sera de type sauvage dans le cadre des mutations de l'EGFR. L'ADN de type sauvage de ce tissu peut diluer l'ADN mutant, éventuellement au point de le rendre indétectable par le kit. Il est toutefois recommandé de tester même les échantillons dont les niveaux tumoraux sont

faibles, ce qui favorise la détection potentielle de taux élevés de mutations et permet de décider d'un traitement pour le patient.

Pour maximiser les chances de détecter les mutations, procéder comme suit.

- Colorer au moins une lame de chaque échantillon de patient à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E).
- S'assurer qu'un pathologiste vérifie la présence de tumeur sur la lame colorée.
- Si possible, le pathologiste devrait contrôler plusieurs lames du bloc FFPE.
- Tous les échantillons tumoraux présents peuvent être testés avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

## Isolement d'ADN

L'isolement d'ADN doit être réalisé à l'aide du kit QIAamp® DNA FFPE Tissue.

Procéder à la purification d'ADN conformément aux instructions du Manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) avec les modifications suivantes.

- Prélever les tissus FFPE sur des lames en verre.
- Nettoyer l'excédent de paraffine autour des sections du tissu en grattant avec un scalpel stérile.
- Gratter les sections du tissu dans des tubes de microcentrifugeuse en utilisant un nouveau scalpel pour l'extraction de chaque échantillon.
- La digestion de la protéinase K doit être effectuée pendant 1 heure.
- L'ADN génomique purifié doit être élué dans 200 µL de tampon ATE (fourni dans le kit QIAamp DNA FFPE Tissue).
- Conserver l'ADN génomique purifié à une température comprise entre -15 et -30 °C.
- Il est préférable d'utiliser les lames adjacentes aux lames colorées en H&E au contenu tumoral le plus important, lorsqu'il est possible de les différencier.

**Remarque :** tous les tests du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR génèrent des produits PCR courts. Toutefois, le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR ne fonctionnera pas avec de l'ADN fortement fragmenté.

## Protocole : évaluation de l'échantillon

Ce protocole est destiné à l'évaluation de l'ADN amplifiable total présent dans les échantillons.

### Points importants avant de commencer

- Avant de commencer la procédure, prière de lire « Précautions générales », page 11.
- Prendre le temps de se familiariser avec le Rotor-Gene Q avant de commencer le protocole. Voir le manuel de l'utilisateur de l'instrument.
- Ne pas faire passer la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) ou tout autre mélange contenant de la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) dans l'agitateur : l'enzyme risquerait d'être désactivée.
- Pipetter la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) en plaçant la pointe de la pipette juste sous la surface du liquide pour éviter le risque d'enrobage de la pointe dans une quantité excessive d'enzyme.

### À effectuer avant de commencer

- Avant chaque utilisation, tous les réactifs doivent être mis à décongeler complètement à température ambiante (entre 15 et 25 °C), mélangés en les retournant 10 fois et passés brièvement à la centrifugeuse pour prélever le contenu au fond du tube.
- Laisser la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) atteindre la température ambiante (15–25 °C) avant chaque utilisation. Passer brièvement le tube à la centrifugeuse pour pouvoir prélever l'enzyme au fond du tube.

### Procédure

1. **Décongeler le mélange réactionnel témoin (Ctrl), l'eau sans nucléase pour le NTC et le témoin positif (PC) EGFR à température ambiante (entre 15 et 25 °C). Une fois les réactifs décongelés, les mélanger en retournant chaque tube 10 fois pour éviter les concentrations locales de sels, puis les passer brièvement à la centrifugeuse pour prélever le contenu se trouvant au fond du tube.**
2. **Préparer des master mix suffisants pour les échantillons d'ADN, une réaction de témoin positif et une réaction de témoin négatif en respectant les volumes donnés dans le Tableau 1. Inclure des réactifs pour 1 échantillon supplémentaire pour disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR.**

Le master mix contient tous les composants nécessaires pour la PCR, excepté l'échantillon.

**Tableau 1. Préparation du master mix du test témoin\***

Composant	Volume/réaction ( $\mu\text{L}$ )
Mélange réactionnel témoin (Ctrl)	19,5
Taq ADN polymérase (Taq)	0,5
<b>Volume total</b>	<b>20,0</b>

\* Lors de la préparation, préparer suffisamment de master mix pour un échantillon supplémentaire.

- 3. Mélanger complètement le master mix en pipettant doucement l'ensemble 10 fois. Ajouter immédiatement 20  $\mu\text{L}$  de master mix dans le tube PCR (non fourni).**

**Remarque :** pour l'évaluation des échantillons, le master mix du test témoin doit être ajouté à un puits de témoin positif, un puits de témoin négatif et un puits pour chaque échantillon.

- 4. Ajouter immédiatement un échantillon de 5  $\mu\text{L}$  d'eau sans nucléase ( $\text{H}_2\text{O}$ ) au tube de témoin négatif (tube de PCR n° 9) et boucher le tube. Ajouter 5  $\mu\text{L}$  d'ADN d'échantillon aux tubes d'échantillon et boucher les tubes. Ajouter 5  $\mu\text{L}$  de témoin positif EGFR (PC) au tube de témoin positif (tube de PCR 1) et boucher le tube.**
- 5. Placer les tubes de PCR aux emplacements adéquats dans le rotor et vérifier qu'ils contiennent tous le même volume.**

**Remarque :** s'assurer que les barrettes de tubes ne sont pas inversées lors de leur transfert dans le rotor.
- 6. Si le rotor n'est pas plein, remplir les espaces restants avec des tubes vides bouchés.**
- 7. Placer immédiatement le rotor de 72 puits dans l'instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM. Vérifier que la bague de fermeture (accessoire de l'instrument Rotor-Gene Q) est placée au-dessus du rotor pour que les tubes ne bougent pas lors de l'analyse.**
- 8. Se reporter aux instructions de préparation de l'instrument Rotor-Gene Q (voir « Protocole : configuration du Rotor-Gene Q EGFR », page 22) pour créer le profil de température et démarrer l'analyse.**



**Tableau 2. Paramètres de cycle**

Cycles	Température	Temps	Acquisition des données
1	95 °C	15 minutes	Aucune
40	95 °C	30 secondes	Aucune
	60 °C	60 secondes	Vert et jaune

- 9. Une fois l'analyse terminée, analyser les données conformément à « Analyse des données d'évaluation de l'échantillon », page 32.**

## Protocole : détection des mutations EGFR

Ce protocole est utilisé pour la détection des mutations EGFR. Une fois l'évaluation de l'échantillon réussie, ce dernier peut être testé à l'aide des tests de mutation EGFR.

### Points importants avant de commencer

- Avant de commencer la procédure, prière de lire « Précautions générales », page 11.
- Prendre le temps de se familiariser avec le Rotor-Gene Q avant de commencer le protocole. Voir le manuel de l'utilisateur de l'instrument.
- Ne pas faire passer la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) ou tout autre mélange contenant de la *Taq* ADN polymérase dans l'agitateur : l'enzyme risquerait d'être désactivée.
- Pour une utilisation efficace du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, les échantillons doivent être regroupés en lots de 7 pour remplir le rotor de 72 puits. Avec des lots plus petits, moins d'échantillons pourront être testés avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.
- Pipetter la *Taq* en plaçant la pointe de la pipette juste sous la surface du liquide pour éviter le risque d'enrobage de la pointe dans une quantité excessive d'enzyme.
- Pour chaque échantillon d'ADN, les tests témoins et de mutation doivent être analysés avec la même analyse PCR afin d'éviter toute variation.

### À effectuer avant de commencer

- Avant chaque utilisation, tous les réactifs doivent être mis à décongeler complètement à température ambiante (entre 15 et 25 °C), mélangés en les retournant 10 fois et passés brièvement à la centrifugeuse pour prélever le contenu au fond du tube.
- S'assurer que la *Taq* est à température ambiante (entre 15 et 25 °C) avant chaque utilisation. Passer brièvement le tube à la centrifugeuse pour pouvoir prélever l'enzyme au fond du tube.

### Procédure

- 1. Décongeler les mélanges réactionnels, l'eau sans nucléase pour le témoin négatif (NTC) et le témoin positif (PC) EGFR à température ambiante (entre 15 et 25 °C). Une fois les réactifs décongelés, les mélanger en retournant chaque tube 10 fois pour éviter les concentrations locales de sels, puis les passer brièvement à la centrifugeuse pour prélever le contenu se trouvant au fond du tube.**

2. **Préparer des master mix suffisants pour les échantillons d'ADN, une réaction de témoin positif et une réaction de témoin négatif en respectant les volumes donnés dans le Tableau 3. Inclure des réactifs pour 1 échantillon supplémentaire pour disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR.**

Le master mix contient tous les composants nécessaires pour la PCR, excepté l'échantillon.

**Tableau 3. Préparation des master mix\***

Composant	Volume/réaction (µL)
Mélange réactionnel	19,5
Taq ADN polymérase (Taq)	0,5
<b>Volume total</b>	<b>20,0</b>

\* Lors de la préparation, préparer suffisamment de master mix pour un échantillon supplémentaire.

3. **Mélanger complètement chaque master mix en pipettant doucement l'ensemble 10 fois. Ajouter immédiatement 20 µL de master mix dans chaque tube PCR (non fourni).**
4. **Ajouter immédiatement 5 µL d'eau sans nucléase (H<sub>2</sub>O) aux tubes PCR de témoin négatif (tubes de PCR 9 à 16) et boucher les tubes. Ajouter 5 µL de chaque échantillon aux tubes d'échantillon (tubes de PCR n° 17 à 72) et boucher les tubes. Ajouter 5 µL de témoin positif EGFR (PC) aux tubes de témoin positif (tubes de PCR n° 1 à 8). Chaque échantillon d'ADN doit être testé à la fois avec le témoin et avec tous les tests de mutation. La disposition est indiquée dans le Tableau 4.**

**Tableau 4. Disposition pour les tests témoin et de mutation**

Test	Témoins		Numéro de l'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
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Insertions	8	16	24	32	40	48	56	64	72

- Placer les tubes de PCR aux emplacements adéquats dans le rotor et vérifier qu'ils contiennent tous le même volume.

**Remarque :** s'assurer que les barrettes de tubes ne sont pas inversées lors de leur transfert dans le rotor.

- Si le rotor n'est pas plein, remplir les espaces restants avec des tubes vides bouchés.
- Placer immédiatement le rotor dans l'instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM. Vérifier que la bague de fermeture (accessoire de l'instrument Rotor-Gene Q) est placée au-dessus du rotor pour que les tubes ne bougent pas lors de l'analyse.
- Se reporter aux instructions de préparation de l'instrument Rotor-Gene Q (voir « Protocole : configuration du Rotor-Gene Q EGFR », page 22) pour créer le profil de température et démarrer l'analyse.

**Tableau 5. Paramètres de cycle**

Cycles	Température	Temps	Acquisition des données
1	95 °C	15 minutes	Aucune
40	95 °C	30 secondes	Aucune
	60 °C	60 secondes	Vert et jaune

9. Une fois l'analyse terminée, analyser les données conformément à « Analyse des données de mutation EGFR », page 36.■

## Protocole : configuration du Rotor-Gene Q EGFR

Ce protocole est référencé sous « Protocole : évaluation de l'échantillon », page 15, et « Protocole : détection des mutations EGFR », page 18.

### Procédure

#### 1. Créer un profil de température en suivant les étapes ci-dessous.

Réglage des paramètres de test généraux	Figures 1 à 3
Activation initiale de l'enzyme à démarrage à chaud	Figure 4
Amplification de l'ADN	Figures 5 à 7
Réglage des canaux de fluorescence	Figures 8 à 12
Démarrage de l'analyse	Figure 13

Pour résumer, les paramètres de cycle se présentent de la manière suivante.

**Tableau 6. Paramètres de cycle**

Cycles	Température	Temps	Acquisition des données
1	95 °C	15 minutes	Aucune
40	95 °C	30 secondes	Aucune
	60 °C	60 secondes	Vert et jaune

Toutes les spécifications se trouvent sur le logiciel du Rotor-Gene Q version 2.0.2. Pour de plus amples informations sur la programmation des instruments Rotor-Gene Q, se reporter au manuel de l'utilisateur de l'instrument. Dans les illustrations, ces paramètres sont encadrés en gras et en noir.

- Double-cliquer sur l'icône du logiciel Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2 sur le bureau du PC connecté à l'instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM. Sélectionner l'onglet « Advanced » (avancé) dans la boîte de dialogue « New Run » (nouvelle analyse) qui apparaît.**

3. Pour créer un nouveau modèle, sélectionner « Empty Run » (analyse vide) puis cliquer sur « New » (nouvelle) pour ouvrir le « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse).
4. Sélectionner **72-Well Rotor** (rotor 72 puits) comme type de rotor. Confirmer la bonne fixation de la bague de fermeture en cochant la case « **Locking Ring Attached** » (bague de fermeture fixée). Cliquer sur « **Next** » (suivant) (Figure 1).

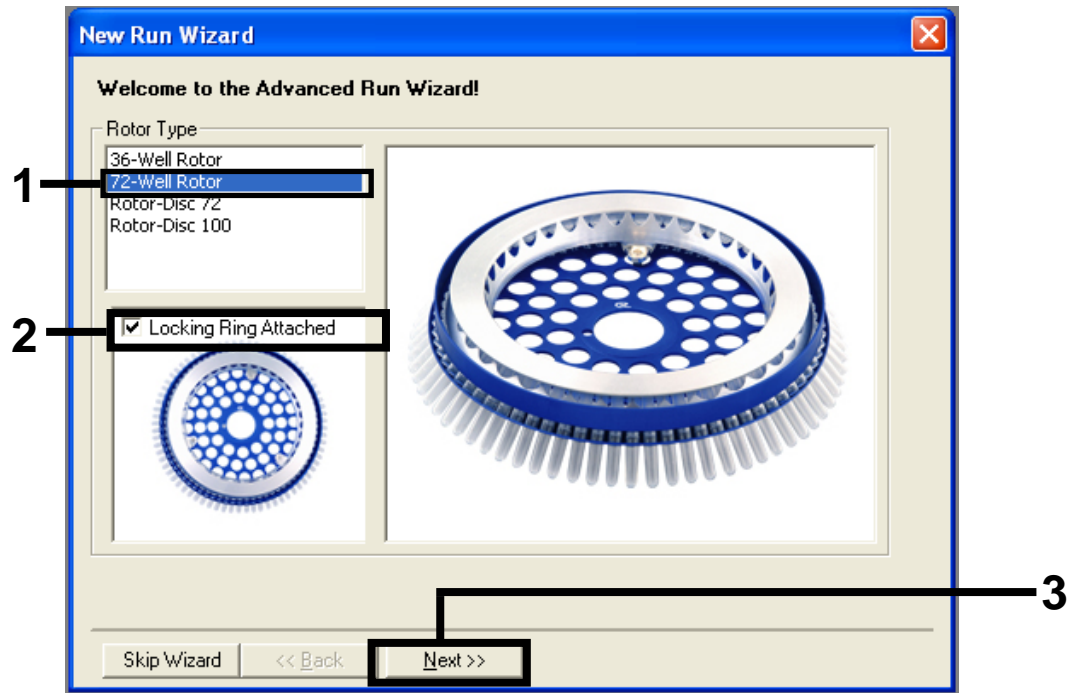


Figure 1. Boîte de dialogue « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse).

5. Saisir le nom de l'opérateur. Ajouter toutes les remarques et définir le volume réactionnel sur 25. S'assurer que « 1, 2, 3... » puisse être lu dans « Sample Layout » (disposition d'échantillon). Cliquer sur « Next » (suivant) (Figure 2).

The screenshot shows the 'New Run Wizard' dialog box with the following fields and annotations:

- 1** points to the 'Operator' text box containing 'QIAGEN'.
- 2** points to the 'Notes' text area.
- 3** points to the 'Reaction Volume (µL)' spinner box set to '25'.
- 4** points to the 'Next >>' button.

The 'Sample Layout' dropdown menu is set to '1, 2, 3...'. A help box on the right contains instructions: 'This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.'

Figure 2. Réglage des paramètres de test généraux.



6. Cliquer sur le bouton « Edit Profile » (modifier profil) dans la boîte de dialogue « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse) suivante (Figure 3) puis programmer le profil de température conformément aux informations contenues dans les étapes suivantes.

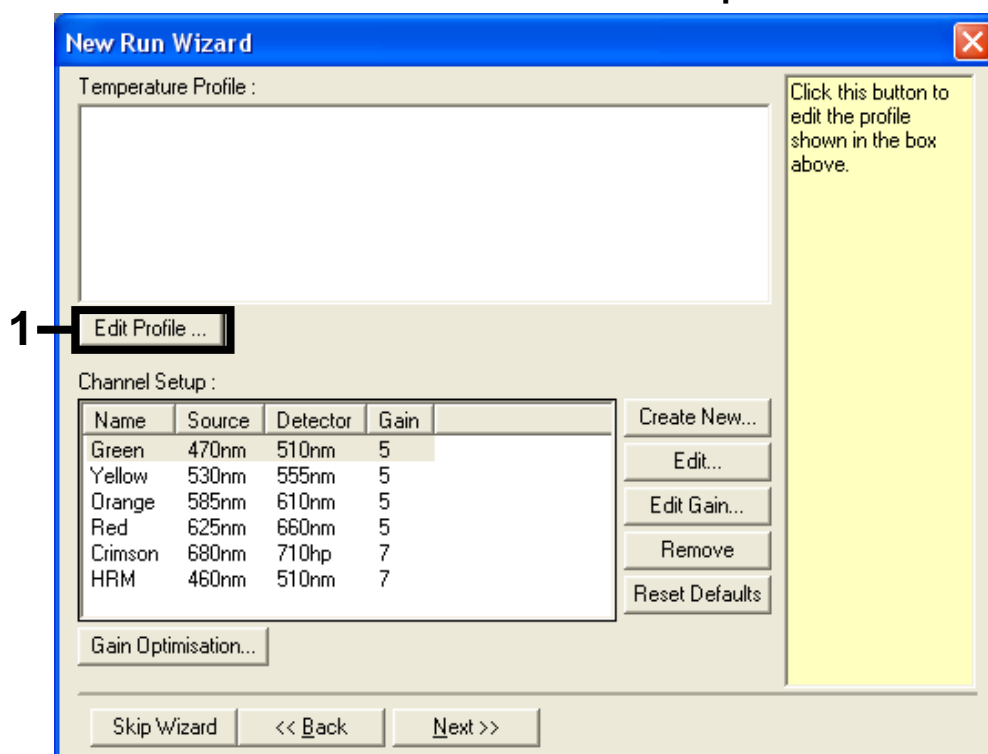


Figure 3. Modification du profil.

7. Cliquer sur le bouton « Insert After » (insérer après) et sélectionner **New Hold at Temperature** (nouvelle température d'attente) (Figure 4).

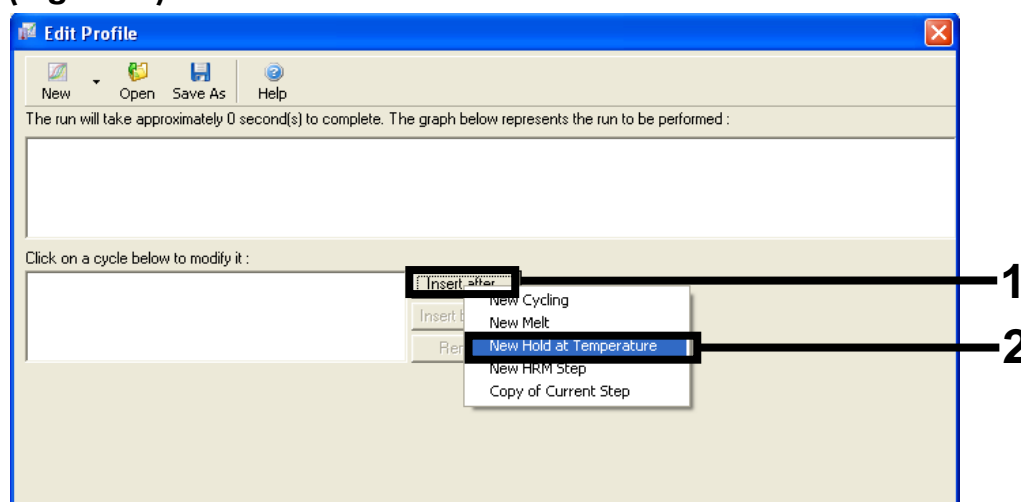


Figure 4. Étape d'incubation initiale à 95 °C.

8. Régler « Hold Temperature » (température d'attente) sur 95 °C et « Hold Time » (temps d'attente) sur 15 min. Cliquer sur le bouton « Insert After » (insérer après), puis sélectionner New Cycling (nouveau cycle) (Figure 5).

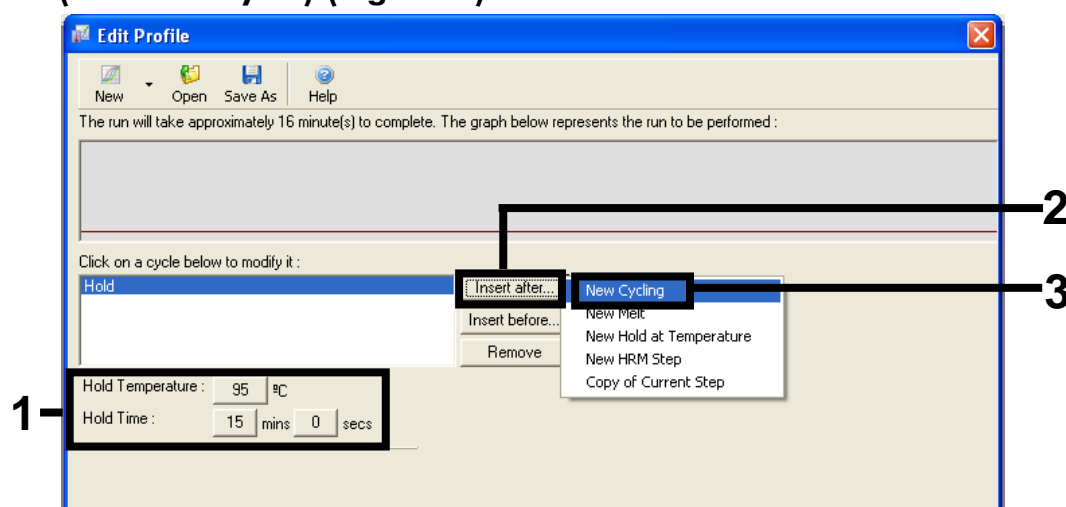


Figure 5. Étape d'incubation initiale à 95 °C.

9. Régler le nombre de répétitions de cycles sur 40. Sélectionner la première étape et régler sur 95°C for 30 secs (95 °C pour 30 secondes) (Figure 6).

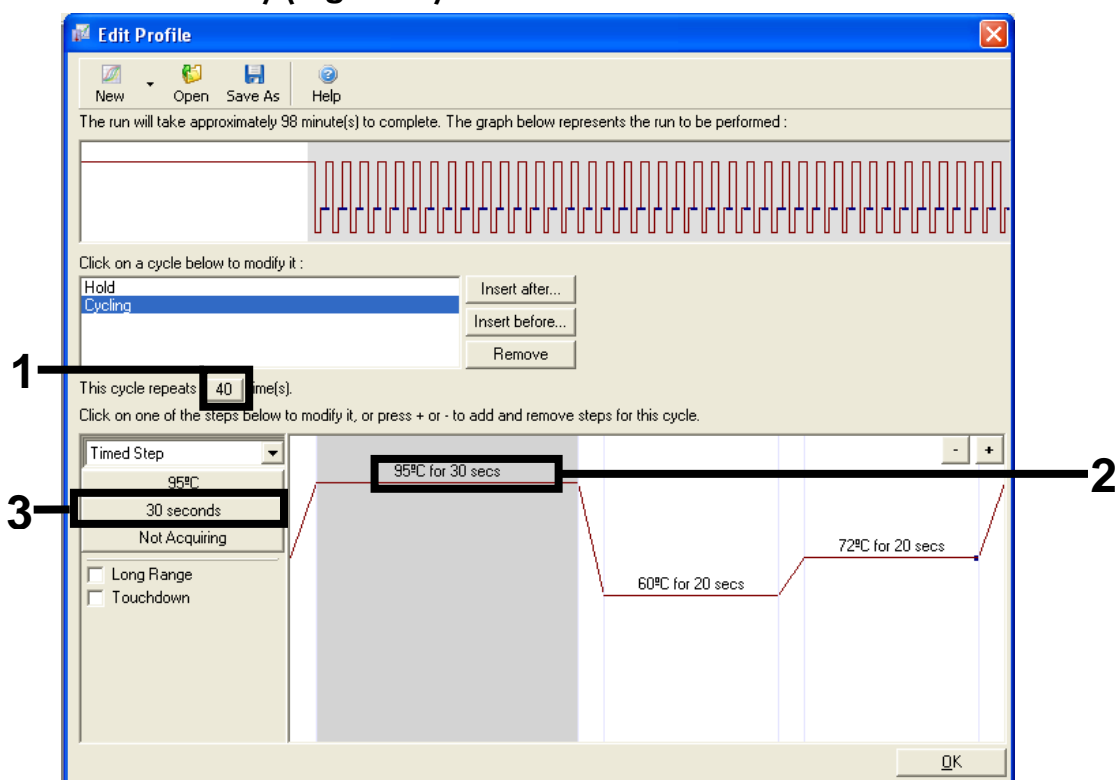


Figure 6. Étape du cycle à 95 °C.

10. Mettre en surbrillance la seconde étape et régler sur 60°C for 60 secs (60 °C pour 60 secondes). Autoriser l'acquisition de données lors de

cette étape en sélectionnant le bouton « Not Acquiring » (pas d'acquisition) (Figure 7).

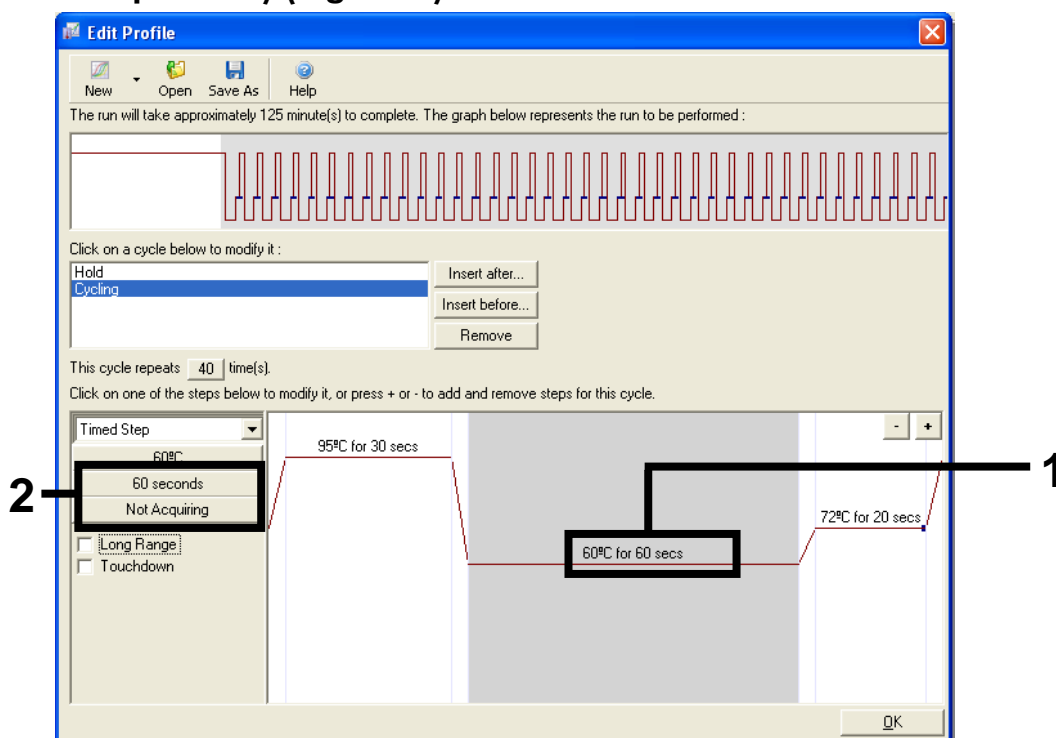


Figure 7. Étape du cycle à 60 °C.

11. Régler Green (vert) et Yellow (jaune) comme « Acquiring Channels » (canaux d'acquisition) en sélectionnant le bouton « > » pour les transférer depuis la liste « Available Channels » (canaux disponibles). Cliquer sur « OK » (Figure 8).

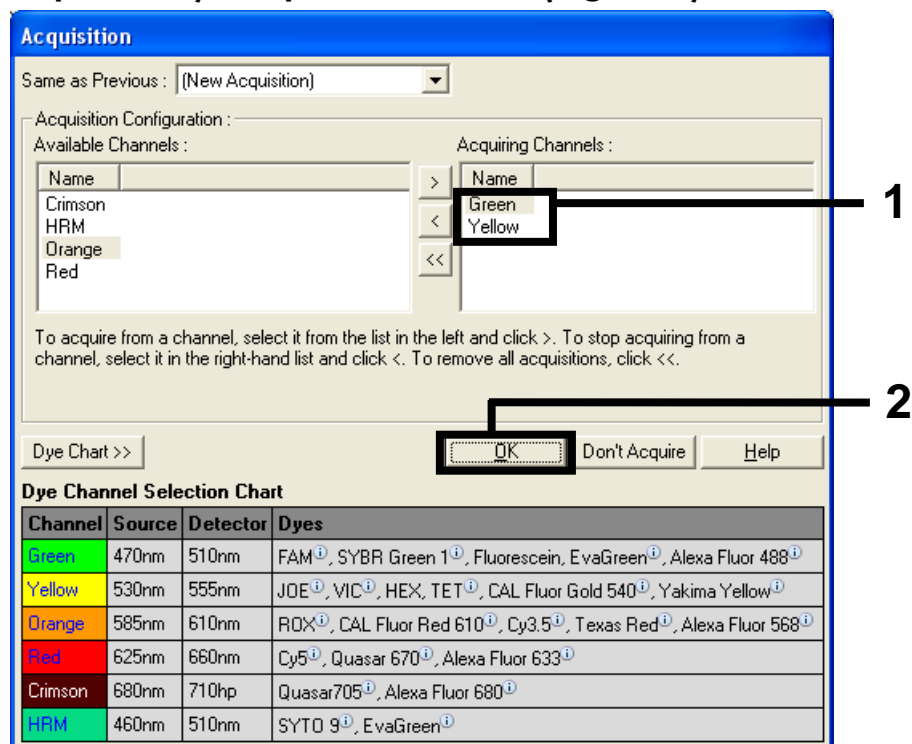


Figure 8. Acquisition à l'étape du cycle à 60 °C.

12. Mettre la troisième étape en surbrillance et la supprimer en cliquant sur le bouton « – ». Cliquer sur « OK » (Figure 9).

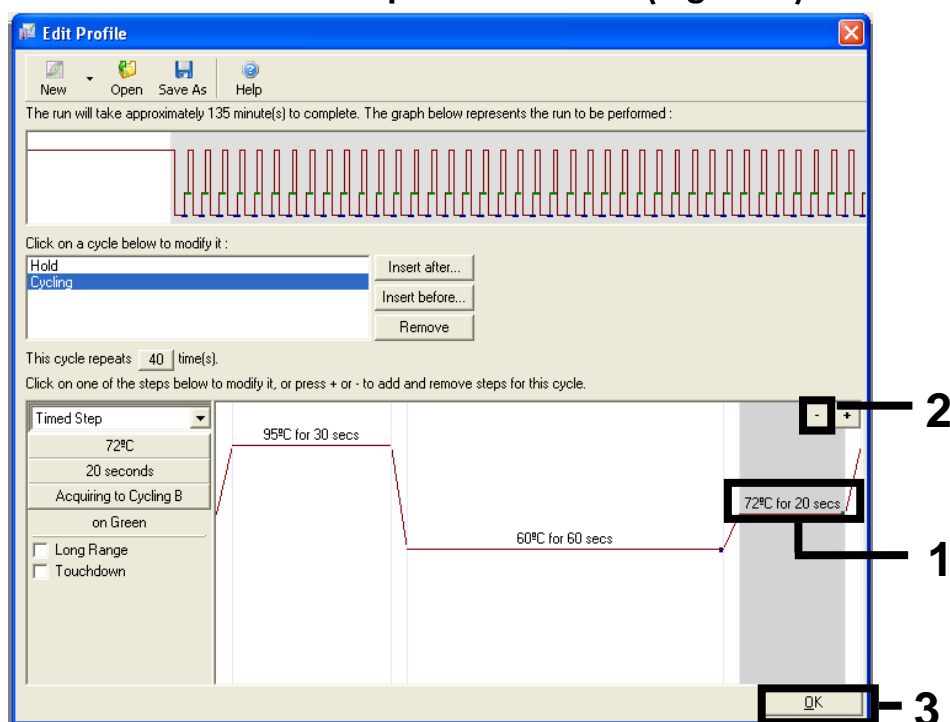


Figure 9. Suppression de l'étape supplémentaire.

13. Dans la boîte de dialogue suivante, cliquer sur le bouton « Gain Optimisation » (optimisation de l'augmentation) (Figure 10).

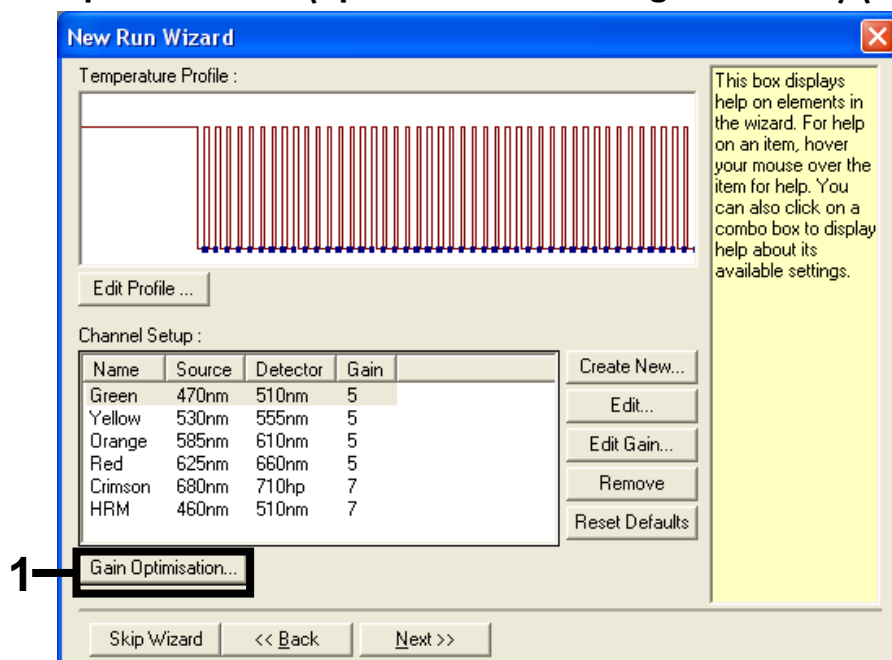


Figure 10. Optimisation de l'augmentation.

14. Cliquer sur le bouton « Optimise Acquiring » (optimiser l'acquisition). Les paramètres des canaux sont affichés pour chaque canal. Accepter ces valeurs par défaut en cliquant sur « OK » pour les deux canaux (Figure 11).

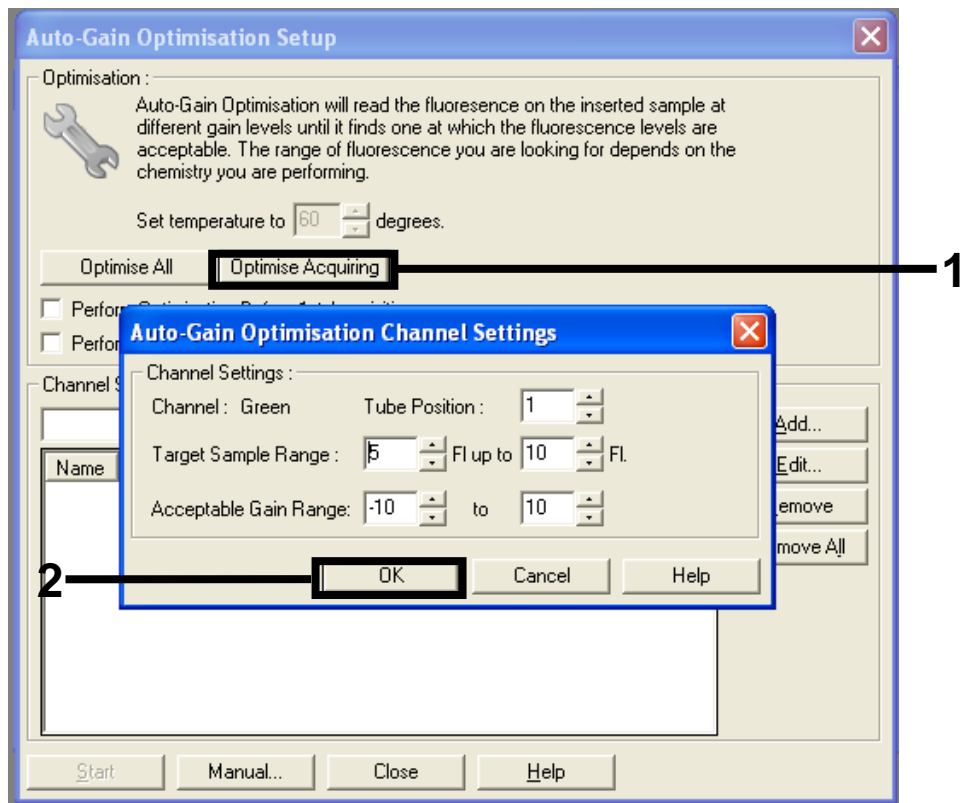


Figure 11. Optimisation automatique de l'augmentation pour le canal vert.

15. Cocher la case « Perform Optimisation before 1st Acquisition » (effectuer optimisation avant 1<sup>ère</sup> acquisition) puis cliquer sur le bouton « Close » (fermer) pour retourner dans l'assistant (Figure 12).

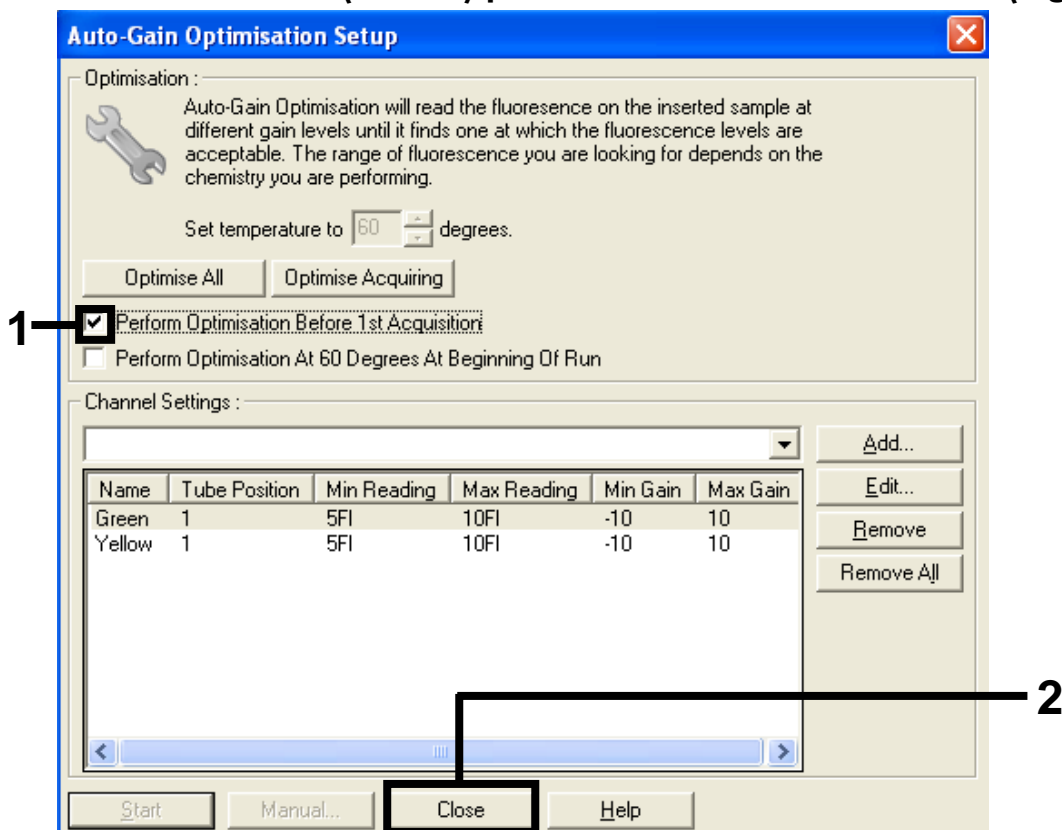
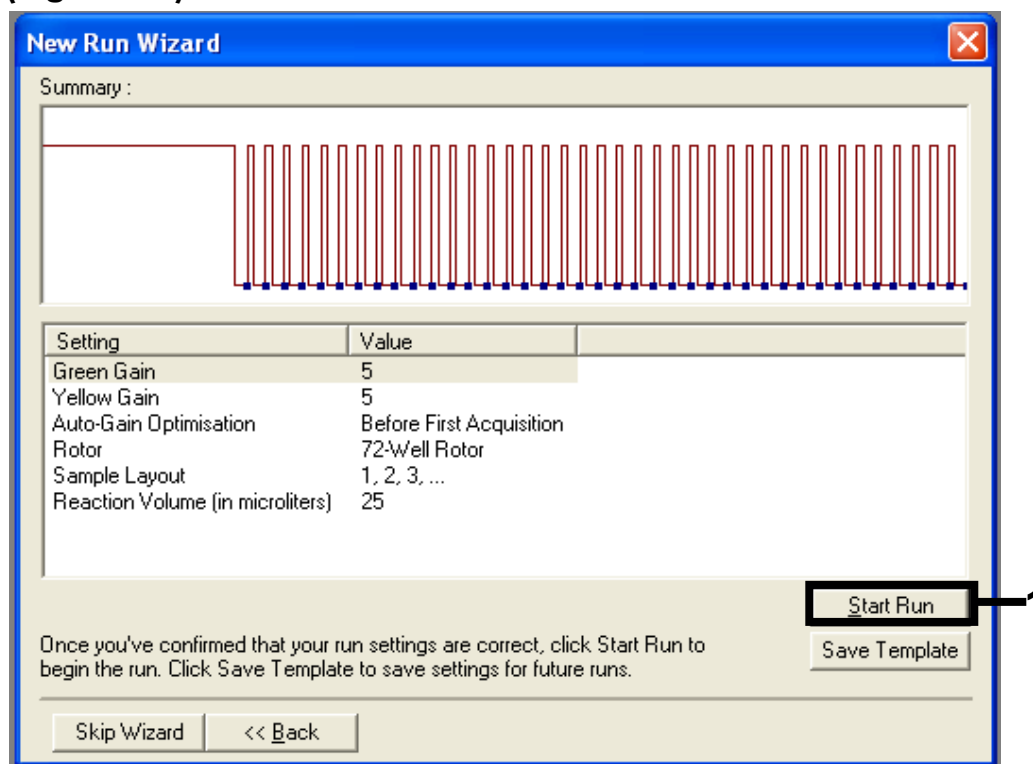


Figure 12. Sélection des canaux vert et jaune.

16. Cliquer sur « Next » (suivant) pour sauvegarder le modèle dans un emplacement approprié en sélectionnant « Save Template » (sauvegarder modèle).

- 17. Vérifier le résumé puis cliquer sur « Start Run » (démarrer analyse) pour sauvegarder le fichier d'analyse et démarrer l'analyse (Figure 13).**



**Figure 13. Démarrage de l'analyse.**

- 18. Une fois l'analyse démarrée, une nouvelle fenêtre s'ouvre, permettant de saisir le nom des échantillons immédiatement ou de cliquer sur « Finish » (terminer) pour les entrer plus tard en sélectionnant le bouton « Sample » (échantillon) lors de l'analyse ou une fois celle-ci terminée.**
- 19. Une fois l'analyse terminée, analyser les données conformément au protocole correspondant :**
- Pour l'évaluation des échantillons, voir « Analyse des données d'évaluation de l'échantillon », page 32.
  - Pour l'analyse des mutations, voir « Analyse des données de mutation EGFR », page 36.

# Interprétation des résultats

## Méthode d'analyse $\Delta C_T$

Les analyses Scorpions en temps réel utilisent le nombre de cycles PCR nécessaire pour détecter un signal fluorescent supérieur à un signal de bruit de fond, afin de quantifier les molécules cibles présentes au début de la réaction. Le point auquel le signal est détecté au-dessus de la fluorescence de bruit de fond est désigné par le terme de « seuil de cycle » ( $C_T$  pour cycle threshold).

Les valeurs  $\Delta C_T$  de l'échantillon sont calculées sur la base de la différence entre le  $C_T$  de test de mutation et le  $C_T$  de test témoin du même échantillon :

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutation} - C_T \text{ témoin}$$

**Remarque** : on estime que les échantillons présentent une mutation positive si leur  $\Delta C_T$  est inférieur à la valeur seuil de  $\Delta C_T$  de ce test. Au-dessus de cette valeur, l'échantillon peut soit contenir moins que le pourcentage de mutation détectable par le kit (au-delà de la limite des tests), soit ne pas présenter de mutation.

**Remarque** : les valeurs de  $C_T$  de mutation atteignant 40 ou plus seront considérées comme négatives ou inférieures aux limites du kit.

En utilisant des amorces ARMS, un amorçage inefficace peut survenir et entraîner un  $C_T$  de bruit de fond très tardif de l'ADN qui ne présente pas de mutation. Toutes les valeurs  $\Delta C_T$  calculées à partir de l'amplification basée sur le bruit de fond seront supérieures aux valeurs seuil de  $\Delta C_T$ . On estimera donc que l'échantillon ne présente pas de mutation.

## Analyse des données d'évaluation de l'échantillon

Une fois l'analyse terminée, analyser les données conformément à la procédure suivante.

### Paramètres d'analyse du logiciel

1. Ouvrir le fichier approprié à l'aide du logiciel Rotor-Gene Q version 2.0.2 ou supérieure.
2. Vérifier que les échantillons sont étiquetés.
3. Sur la page de canal brut, cliquer sur « Options » et entrer **Crop start cycles** (effacer cycles de démarrage) pour chaque détecteur/canal. Sur la page avec « Remove data before cycle » (supprimer données avant cycle), entrer **15** puis cliquer sur « OK ».
4. Cliquer sur « Analysis » (analyse). Sur la page de l'analyse, cliquer sur « Cycling A (from 15), Yellow » (cycle A de 15, jaune) pour vérifier le canal HEX.



5. Vérifier que « dynamic tube » (tube dynamique) est mis en surbrillance. Cliquer sur « Slope correct » (pente correcte) et « Linear Scale » (échelle linéaire).
6. Régler le seuil sur 0,02 puis vérifier les valeurs  $C_T$  de HEX.
7. Sur la page de l'analyse, cliquer sur « Cycling A (from 15), Green » (cycle A de 15, vert) pour afficher le canal FAM.
8. Le tube dynamique doit être mis en surbrillance. Cliquer sur « Slope correct » (pente correcte) et « Linear Scale » (échelle linéaire).
9. Régler le seuil sur 0,075 puis vérifier les valeurs  $C_T$  de FAM.

Une fois l'analyse terminée, analyser les données de la manière suivante.

- **Témoin négatif** : pour garantir l'absence de contamination du modèle, le NTC ne doit pas générer une valeur de  $C_T$  inférieure à 40 dans le canal vert (FAM). Voir « Remarques pour l'interprétation des données » page 42 pour des informations importantes sur l'analyse du tracé du témoin négatif (NTC). Pour garantir le bon paramétrage de l'analyse, le NTC doit afficher une amplification de 31 à 37 dans le canal jaune (HEX).

S'il y a une amplification positive dans le canal vert et/ou une amplification hors de l'intervalle 31 à 37 dans le signal jaune, les résultats de l'échantillon doivent être rejetés.

- **Témoin positif** : le témoin positif (PC) EGFR doit fournir un  $C_T$  de test témoin (canal FAM) compris entre 26,26 et 30,95. Une analyse comportant une valeur  $C_T$  en dehors de cet intervalle indique un problème de paramétrage du test et doit être marquée en tant qu'échec. Si le  $C_T$  du test témoin positif est compris entre 26,26 et 30,95 (exon 2, FAM) mais que le  $C_T$  du témoin interne (HEX) est en dehors de l'intervalle de 31 à 37, poursuivre avec l'analyse.

**Remarque** : les données des échantillons ne doivent pas être utilisées en cas d'échec d'un de ces deux témoins d'analyse.

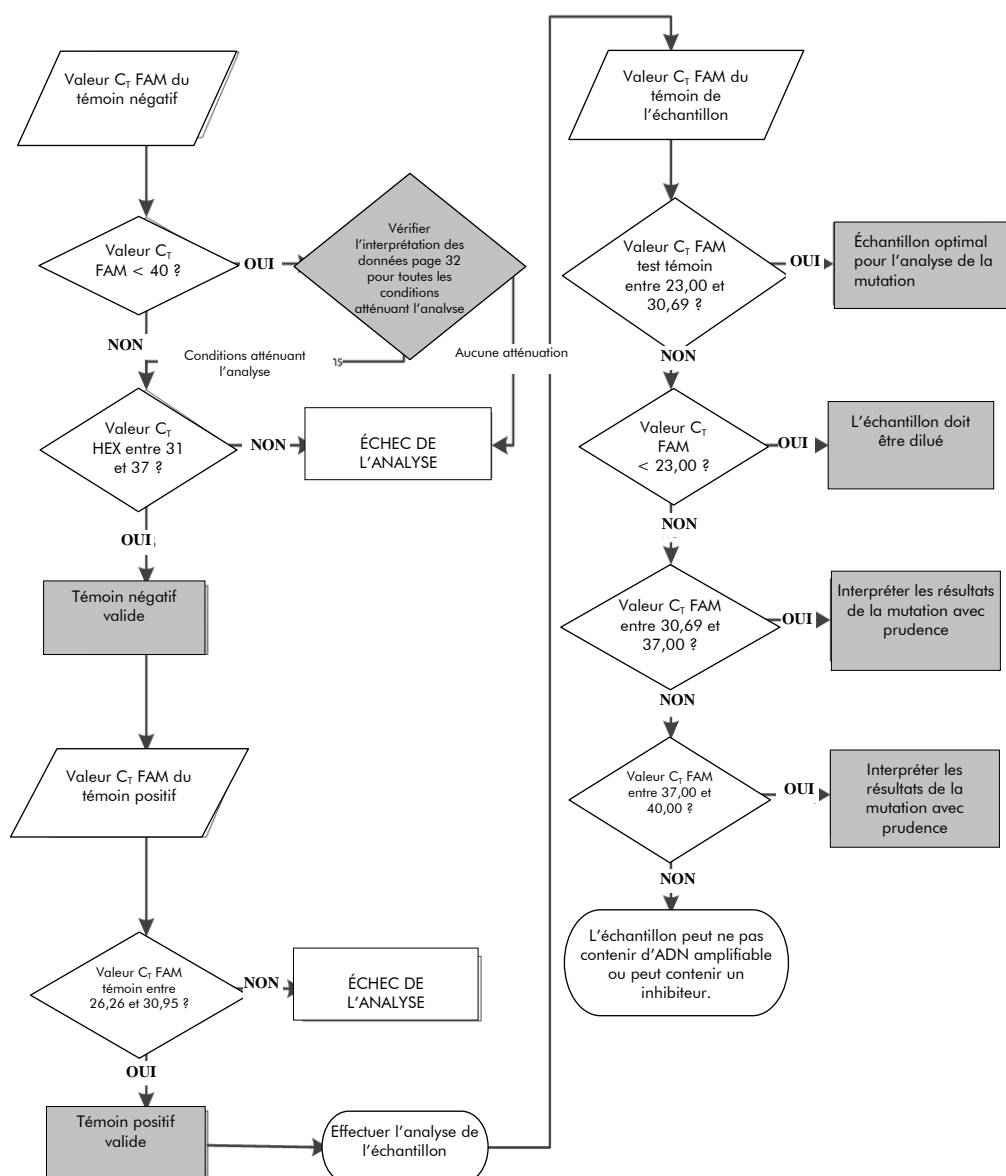
Sous réserve que les deux témoins d'analyse soient valides, chaque valeur  $C_T$  de l'échantillon doit être comprise entre 23 et 30,69 dans le canal vert (FAM). Si l'échantillon se trouve en dehors de ces limites, les critères suivants sont utilisés.

- **$C_T$  de test témoin de l'échantillon < 23** : les échantillons avec un  $C_T$  de témoin inférieur à 23 surchargeront les tests de mutation et doivent être dilués. Pour détecter chaque mutation à un faible niveau, les échantillons surconcentrés doivent être dilués afin d'être compris dans l'intervalle mentionné, en considérant que la dilution de moitié augmentera le  $C_T$  d'1.

- **$C_T$  de test témoin de l'échantillon compris entre 30,69 et 37 :** interpréter ces résultats avec prudence car des mutations de très faible niveau peuvent ne pas être détectées.
- **$C_T$  de test témoin de l'échantillon compris entre 37 et 40 :** interpréter ces résultats avec prudence car seules les mutations de niveau très élevé seront détectées.
- **$C_T$  de test témoin de l'échantillon  $> 40$  :** l'échantillon ne contient pas suffisamment d'ADN pour permettre l'analyse.

**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, d'une erreur dans la configuration du test ou à l'absence d'ADN amplifiable d'EGFR.

- **Valeur  $C_T$  de témoin interne comprise entre 31 et 37 :** pas d'ADN amplifiable d'EGFR.
- **Valeur  $C_T$  de témoin interne comprise entre 31 et 37 :** pourrait indiquer une erreur dans la configuration du test ou la présence d'un inhibiteur. Il est possible de réduire l'effet d'un inhibiteur en diluant l'échantillon, mais l'ADN sera alors lui aussi dilué.



**Figure 14. Déroulement des opérations pour l'analyse de l'évaluation de l'échantillon.**

## Analyse des données de mutation EGFR

Une fois l'analyse terminée, analyser les données conformément à la procédure suivante.

### Paramètres d'analyse du logiciel

1. Ouvrir le fichier approprié à l'aide du logiciel Rotor-Gene Q version 2.0.2 ou supérieure.
2. Vérifier que les échantillons sont étiquetés.
3. Sur la page de canal brut, cliquer sur « Options » et entrer *Crop start cycles* (effacer cycles de démarrage) pour chaque détecteur/canal. Sur la page avec « Remove data before cycle » (supprimer données avant cycle), entrer 15 puis cliquer sur « OK ».
4. Cliquer sur « Analysis » (analyse). Sur la page de l'analyse, cliquer sur « Cycling A (from 15), Yellow » (cycle A de 15, jaune) pour afficher le canal HEX.
5. Vérifier que « dynamic tube » (tube dynamique) est mis en surbrillance. Cliquer sur « Slope correct » (pente correcte) et « Linear Scale » (échelle linéaire).
6. Régler le seuil sur 0,02 puis vérifier les valeurs  $C_T$  de HEX.
7. Sur la page de l'analyse, cliquer sur « Cycling A (from 15), Green » (cycle A de 15, vert) pour afficher le canal FAM.
8. Vérifier que « dynamic tube » (tube dynamique) est mis en surbrillance. Cliquer sur « Slope correct » (pente correcte) et « Linear Scale » (échelle linéaire).
9. Régler le seuil sur 0,075 puis vérifier les valeurs  $C_T$  de FAM.

### Exécuter l'analyse de contrôle :

Consulter l'organigramme de la Figure 15 relatif à l'exécution de l'analyse de contrôle.

- **Témoin négatif** : pour garantir l'absence de contamination du modèle, le NTC ne doit pas générer une valeur de  $C_T$  inférieure à 40 dans le canal vert (FAM). Voir « Remarques pour l'interprétation des données » page 42 pour des informations importantes sur l'analyse du tracé du témoin négatif (NTC). Pour garantir le bon paramétrage de l'analyse, le NTC doit afficher une amplification de  $C_T$  de 31 à 37 dans le canal jaune (HEX).

S'il y a une amplification positive dans le canal vert et/ou une amplification hors de l'intervalle 31 à 37 dans le signal jaune, les résultats de l'échantillon doivent être rejetés.

- **Témoin positif** : le témoin positif (PC) EGFR doit fournir un  $C_T$  de test témoin compris entre 26,26 et 30,95 dans le canal vert. Une analyse

comportant une valeur  $C_T$  en dehors de cet intervalle indique un problème de paramétrage du test et doit être marquée en tant qu'échec. Si le  $C_T$  du test témoin positif est compris entre 26,26 et 30,95 (exon 2, FAM) mais que le  $C_T$  du témoin interne (HEX) est en dehors de l'intervalle de 31 à 37, poursuivre avec l'analyse.

Calculer la valeur de  $\Delta C_T$  de chaque test de mutation de la manière suivante, tout en s'assurant que les valeurs de  $C_T$  du témoin et de la mutation proviennent du témoin positif.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutation} - C_T \text{ témoin}$$

Les valeurs de  $\Delta C_T$  du témoin positif EGFR (PC) devraient tomber dans l'intervalle de valeurs fournies dans le Tableau 7.

**Tableau 7. Valeurs  $\Delta C_T$  de témoin positif attendues\***

Test	Valeur $\Delta C_T$ du témoin positif (PC)
T790M	-2,88 à 3,01
Délétions	-6,71 à 4,16
L858R	-2,41 à 0,90
L861Q	-4,61 à 1,48
G719X	-2,89 à 1,03
S768I	-3,37 à 2,31
Insertions	-2,93 à 1,28

\* Logiciel Rotor-Gene Q (version 2.0.2)

**Remarque :** les données des échantillons ne doivent pas être utilisées en cas d'échec des témoins d'analyse positif ou négatif.



- **$C_T$  de test témoin de l'échantillon > 40** : l'échantillon ne contient pas suffisamment d'ADN pour permettre l'analyse.

**Remarque** : si la valeur  $C_T$  FAM de l'échantillon est comprise entre 23 et <37, l'évaluation du témoin interne n'est pas nécessaire.

**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, d'une erreur dans la configuration du test ou à l'absence d'ADN amplifiable d'EGFR.

- **Valeur  $C_T$  de témoin interne comprise entre 31 et 37** : le test fonctionne correctement, mais il n'y a pas d'ADN amplifiable d'EGFR.
- **Valeur  $C_T$  de témoin interne comprise entre 31 et 37** : pourrait indiquer une erreur dans la configuration du test ou la présence d'un inhibiteur. Il est possible de réduire l'effet d'un inhibiteur en diluant l'échantillon, mais l'ADN sera alors lui aussi dilué.

**Remarque** : si la réaction FAM au test de mutation ne génère pas de valeur  $C_T$  et que les réactions de témoin interne génèrent une valeur  $C_T$  en dehors de l'intervalle de 31 à 37, les données doivent être rejetées car la présence potentielle d'inhibiteurs pourrait engendrer des faux négatifs. La dilution de l'échantillon peut réduire l'effet des inhibiteurs, mais il faut noter que l'ADN serait alors lui aussi dilué.

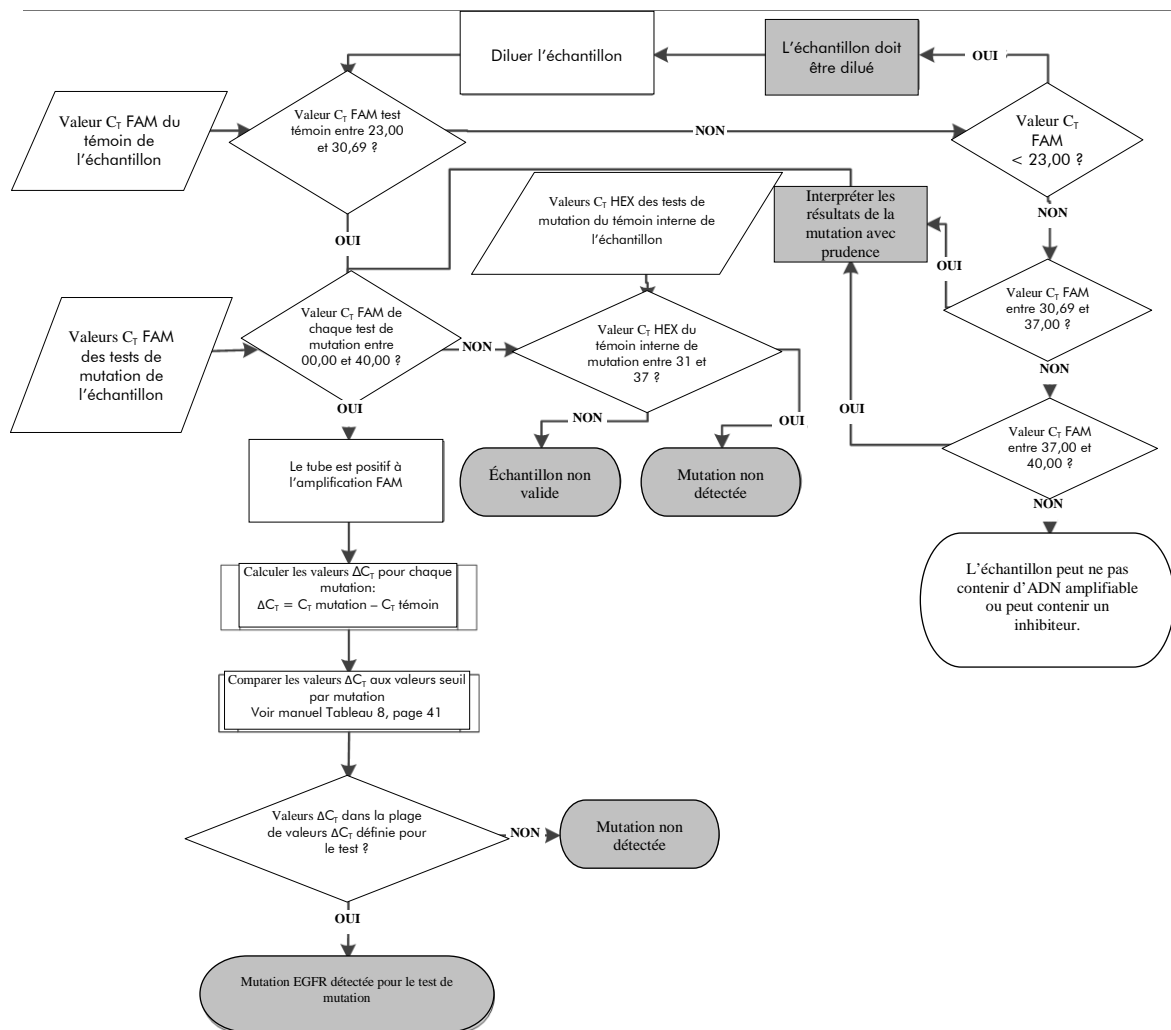


Figure 16. Organigramme relatif à l'analyse des mutations.



## Valeur $C_T$ FAM des tests de mutation de l'échantillon

Les valeurs FAM des sept mélanges réactionnels de mutation doivent être vérifiées par rapport aux valeurs énumérées dans le Tableau 8.

**Tableau 8. Valeurs de réaction de mutation d'échantillon acceptables (FAM)\***

Test	Limites acceptables de $C_T$	Valeur $\Delta C_T$ seuil
T790M	15,00–40,00	6,38
Délétions	15,00–40,00	9,06
L858R	15,00–40,00	8,58
L861Q	15,00–40,00	9,26
G719X	15,00–40,00	9,31
S768I	15,00–40,00	9,26
Insertions	15,00–40,00	7,91

\* Les valeurs acceptables comprennent et sont comprises dans les valeurs indiquées.

- Si la valeur  $C_T$  FAM est conforme à l'intervalle spécifié de 15,00 à 40,00, l'échantillon est positif à l'amplification FAM.
- Si la valeur  $C_T$  FAM est supérieure à l'intervalle spécifié ou qu'il n'existe aucune amplification, l'échantillon est négatif à l'amplification FAM.

Calculer la valeur de  $\Delta C_T$  de chaque échantillon de mutation indiquant une amplification positive de la manière suivante, tout en s'assurant que les valeurs de  $C_T$  du témoin et de la mutation proviennent du même échantillon.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutation} - C_T \text{ témoin}$$

Comparer la valeur  $\Delta C_T$  de l'échantillon avec le point seuil du test en question (Tableau 8) en s'assurant que le point seuil correct est bien appliqué à chaque test.

Le point seuil est le point au-dessus duquel un signal positif peut éventuellement provenir du signal de bruit de fond de l'amorce ARMS sur l'ADN de type sauvage. Si la valeur  $\Delta C_T$  de l'échantillon est supérieure au point seuil, 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 inférieure ou égale au

point seuil, l'échantillon est considéré comme positif pour une mutation détectée par ce test.

**Remarque** : pour les échantillons n'indiquant aucune valeur  $C_T$  FAM de mutation, une évaluation du  $C_T$  du témoin interne (HEX) est nécessaire afin de déterminer si la mutation n'est pas détectée ou si le test est invalide. Si la valeur  $C_T$  HEX est comprise entre 31 et 37, la mutation n'est pas détectée. Si la valeur  $C_T$  HEX est en dehors de l'intervalle de 31 à 37, l'échantillon n'est pas valide.

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

- **Mutation détectée** : l'amplification FAM positive et valeurs  $\Delta C_T$  inférieures ou égales à la valeur seuil. Si plusieurs mutations sont détectées, elles peuvent toutes être rapportées.
- **Mutation non détectée** :  
amplification FAM positive et valeurs  $\Delta C_T$  supérieures à la valeur seuil.  
L'amplification FAM est négative et l'amplification HEX (témoin interne) est positive.
- **Non valide** :  
L'amplification FAM et l'amplification HEX sont hors des intervalles spécifiés.

## Remarques pour l'interprétation des données

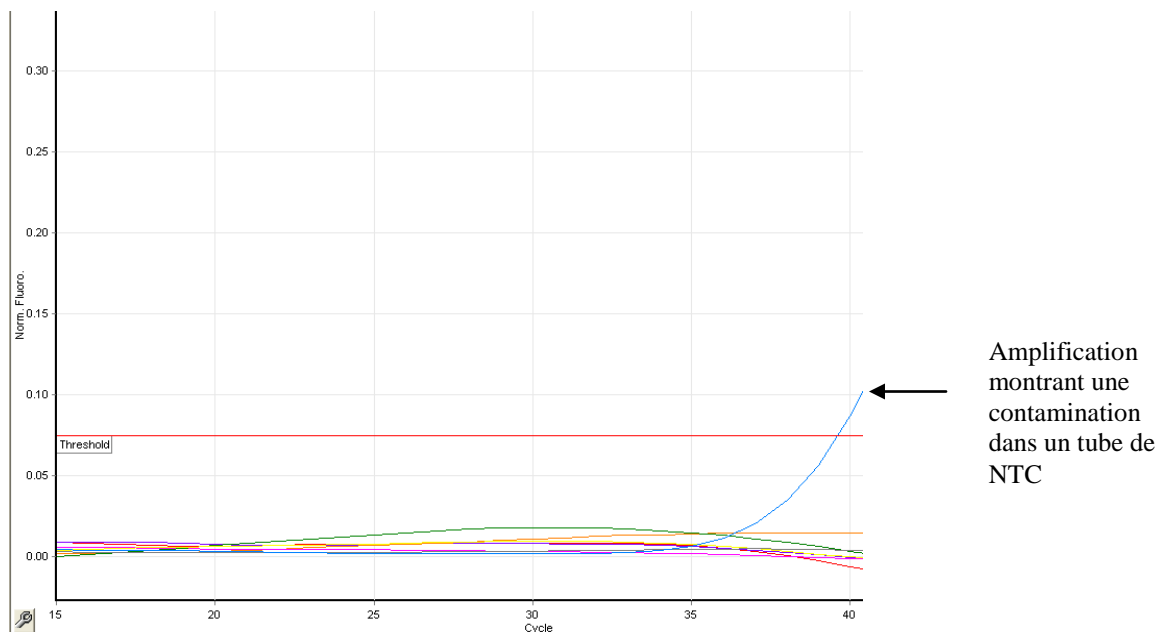
### Amplification linéaire

Les tracés du Rotor-Gene Q de toutes les réactions devraient être vérifiés. Une augmentation du signal de fluorescence apparaît occasionnellement dans le NTC et les échantillons négatifs. Si tel est le cas et si une valeur  $C_T$  est obtenue, l'utilisateur doit faire la distinction entre une réelle amplification, qui indiquerait une contamination dans le NTC, et une augmentation linéaire de la fluorescence, qui pourrait être due à un artefact de fluorescence.

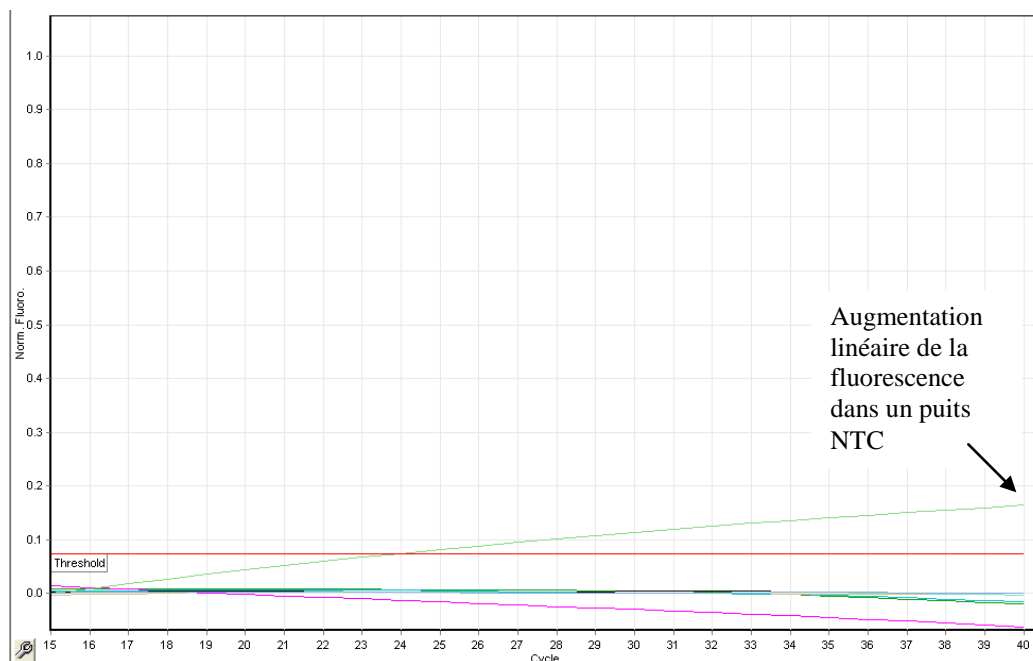
### Analyse du NTC

Les figures 17 et 18 montrent deux exemples du comportement des échantillons de NTC. La Figure 17 indique une amplification réelle, non linéaire, due à la contamination des échantillons. Cette analyse devrait être rejetée et les échantillons retestés. La Figure 18 indique une amplification linéaire dans un NTC. Dans ces circonstances, la fluorescence brute devrait être examinée. Le tracé correspondant à la fluorescence brute se trouve à la Figure 19, indiquant une augmentation linéaire de la fluorescence plutôt qu'une réelle amplification. Les données de cette analyse peuvent être utilisées à condition que les témoins positifs et internes aient été acceptés. La Figure 19 montre les données de

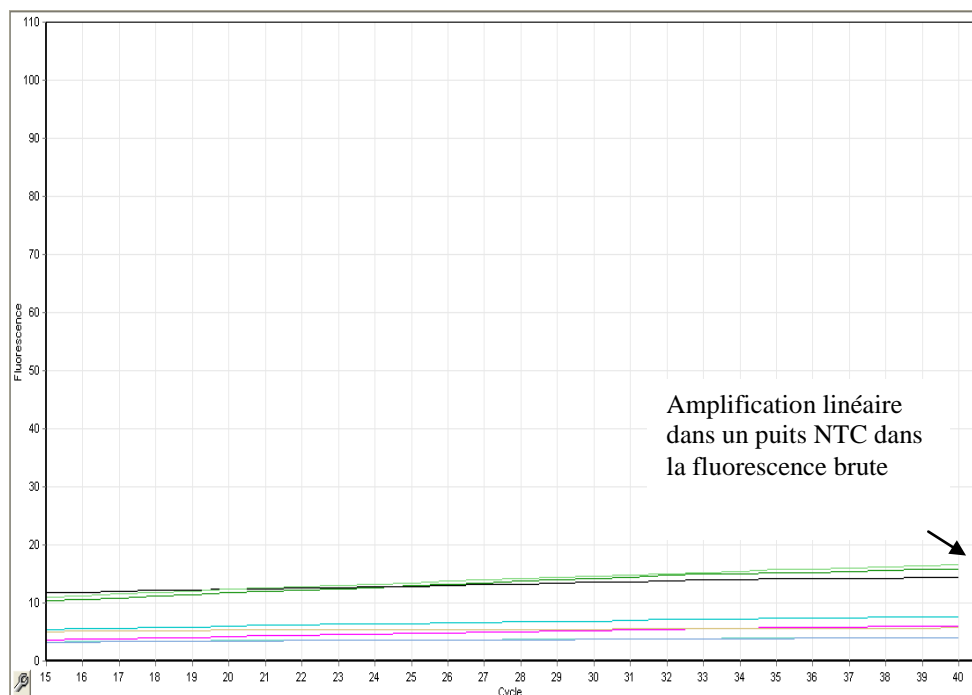
fluorescence brute où l'amplification réelle s'est produite, en comparaison avec la Figure 20. Dans ces circonstances, les données devraient être rejetées et les échantillons retestés, étant donné que cela indique une contamination.



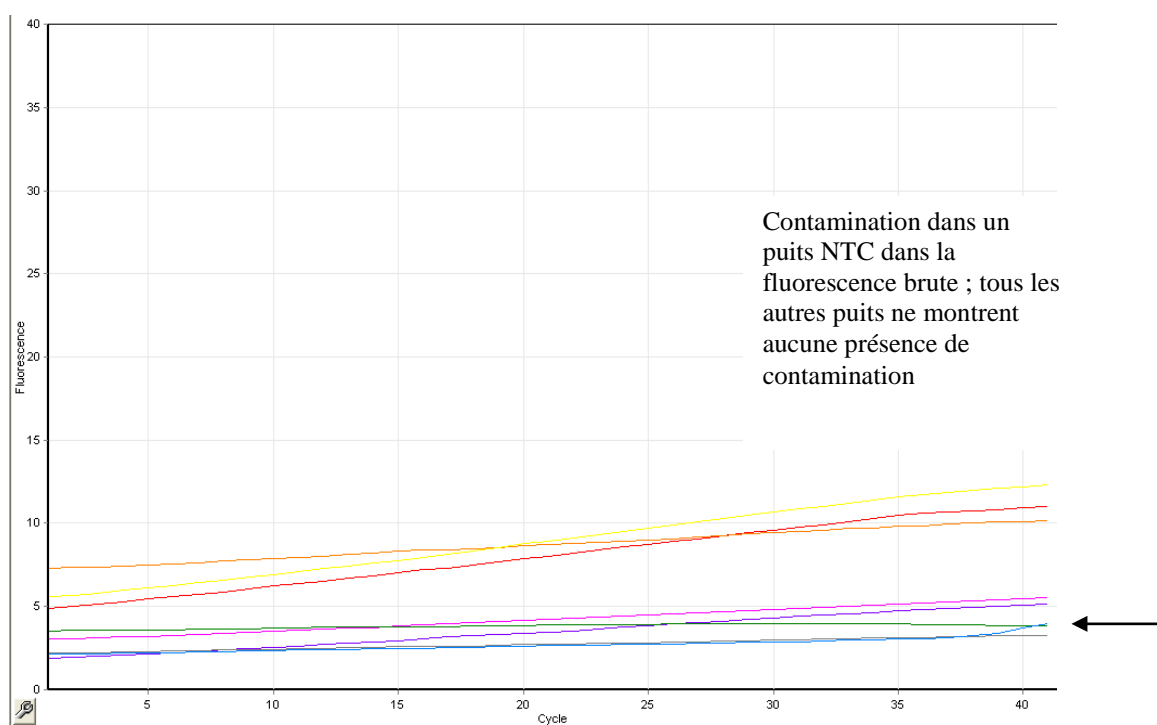
**Figure 17. Contamination dans un NTC d'un test d'une analyse.**



**Figure 18. Exemple d'une augmentation linéaire de la fluorescence dans un puits NTC.**



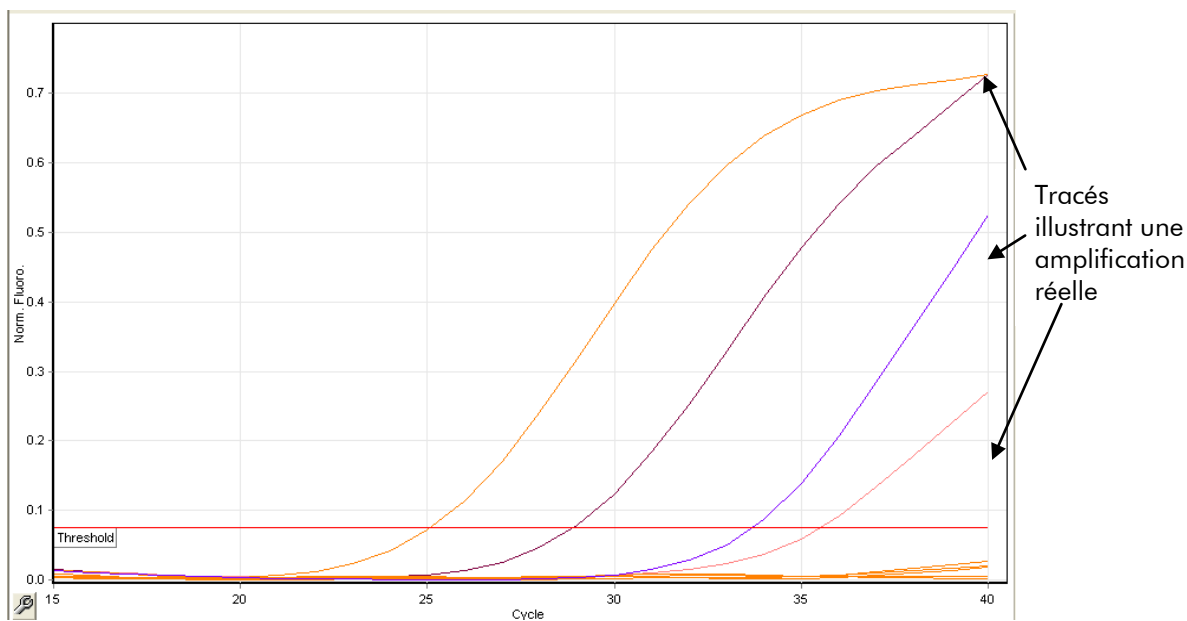
**Figure 19. Fluorescence brute de la Figure 18.**



**Figure 20. Données de fluorescence brute indiquant un puits NTC avec une réelle amplification.**

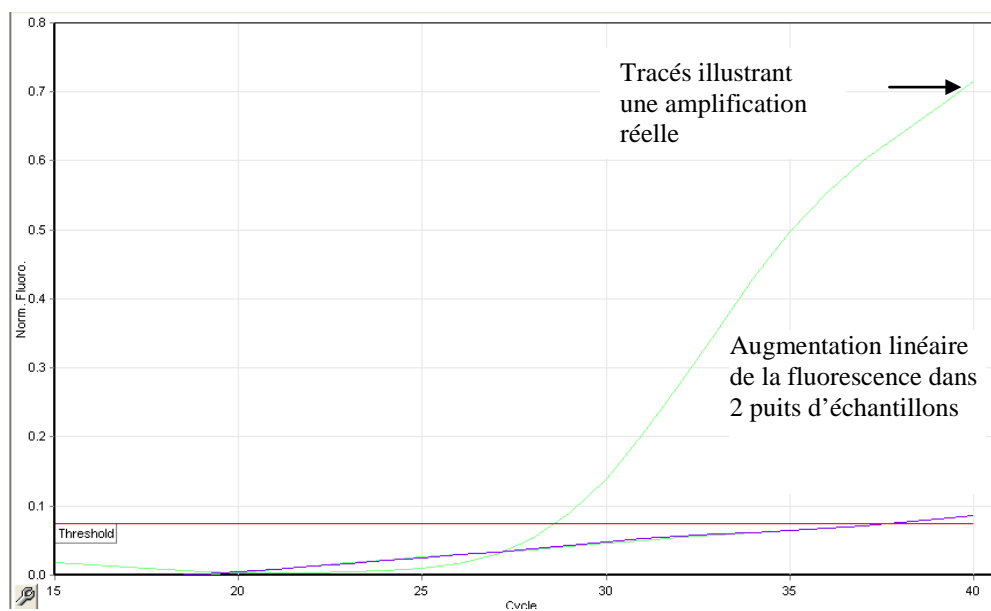
## Analyse des échantillons

Les figures 21 et 22 montrent deux exemples d'amplification dans les réactions d'échantillons. La Figure 21 illustre un exemple d'amplification réelle dans un puits d'échantillon d'une analyse. Si une analyse montre ce type de courbe d'amplification sigmoïde, il s'agit d'une amplification réelle et les données de cette analyse peuvent être utilisées à condition que les témoins positifs et internes aient été acceptés.

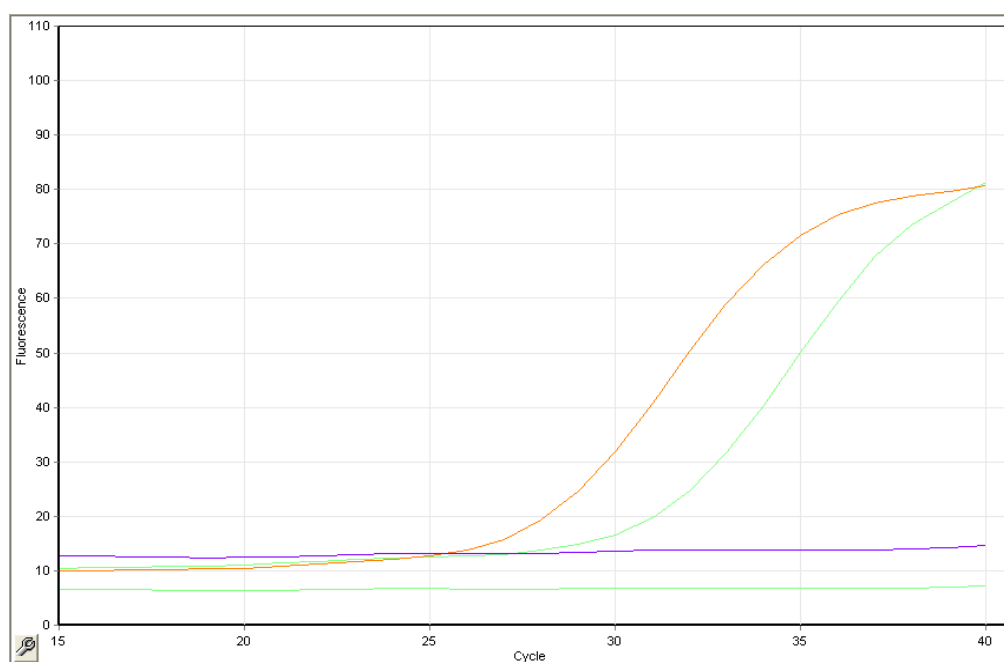


**Figure 21. Amplification réelle dans un puits d'échantillon d'une analyse.**

La Figure 22 illustre un exemple d'amplification linéaire dans une réaction d'échantillons. Dans ces circonstances, les données de fluorescence brute devraient être examinées. Le tracé correspondant à la fluorescence brute (Figure 23) indique que l'augmentation linéaire observée à la Figure 22 correspond à une augmentation linéaire de la fluorescence brute et non à une amplification réelle. Sous réserve que les vérifications des témoins positif et interne aient été validées, les résultats d'échantillon de ces analyses peuvent être utilisés avec prudence, de sorte que l'amplification linéaire soit annoncée comme « no  $C_T$  » (aucun  $C_T$ ).



**Figure 22. Exemple d'une augmentation linéaire de la fluorescence dans deux puits d'échantillons.**



**Figure 23. Fluorescence brute de la Figure 22.**

## Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour de plus amples informations, consulter également la page de foire aux questions dans notre Centre d'assistance technique à l'adresse suivante : [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Les scientifiques de l'assistance technique de QIAGEN sont toujours heureux de répondre aux questions concernant les informations et les protocoles contenus dans ce manuel ou à propos des technologies d'échantillonnage et de dosage (pour les coordonnées, voir la quatrième de couverture ou visiter le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Commentaires et suggestions

---

#### **Aucun signal avec le témoin positif EGFR (PC) dans le canal de fluorescence Cycling Green**

- |  |   |
|--|---|
| a) Le canal de fluorescence sélectionné pour l'analyse des données de la PCR ne correspond pas au 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 témoin interne. |
| b) Programmation incorrecte du profil de température sur l'instrument Rotor-Gene   | Comparer le profil de température avec le protocole, répéter l'analyse s'il est incorrect.  |
| c) Configuration incorrecte de la PCR  | Vérifier les étapes de travail à l'aide du schéma de pipettage et répéter la PCR si nécessaire.   |
| d) Les conditions de conservation pour au moins un kit de composants ne respectaient pas les instructions données dans « Stockage et manipulation des réactifs » (page 12) | Vérifier les conditions de conservation et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit si nécessaire.                                       |

## Commentaires et suggestions

---

- |  |   |
|--|---|
| e) Le kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR a expiré | Vérifier les conditions de conservation et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit si nécessaire. |
|--|---|

### Signaux avec les témoins négatifs dans le canal de fluorescence Cycling Green de la PCR analytique

- |   |   |
|---|---|
| a) La contamination s'est produite lors de la préparation de la PCR | <p>Répéter la PCR avec de nouveaux réactifs dans les réplicats.</p> <p>Si possible, fermer les tubes de PCR directement après y avoir ajouté les échantillons à tester.</p> <p>Vérifier que l'espace de travail et les instruments sont décontaminés régulièrement.</p> |
| b) La contamination s'est produite lors de l'extraction             | <p>Répéter l'extraction et la PCR des échantillons à tester à l'aide de nouveaux réactifs.</p> <p>Vérifier que l'espace de travail et les instruments sont décontaminés régulièrement.</p>  |

## Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot de kit *therascreen* EGFR RGQ PCR 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 correspondant et ne doivent pas être utilisés seuls pour établir le diagnostic.

Le produit est destiné à être utilisé uniquement par le personnel ayant reçu les instructions et la formation spécialement liées aux procédures de diagnostics *in vitro* et au Rotor-Gene Q.

Les études de validation analytique ont été effectuées à l'aide d'ADN humain extrait d'échantillons de tumeur fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine.

Le produit est destiné à être utilisé uniquement sur l'instrument de PCR en temps réel Rotor-Gene Q, série 5plex HRM.

Il est nécessaire de se conformer strictement au Manuel du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR pour obtenir des résultats optimaux. La dilution des réactifs d'une



manière autre que celle décrite dans ce manuel n'est pas recommandée dans la mesure où elle entraînerait une baisse des performances.

Il est important d'évaluer la quantité et la qualité d'ADN présent dans l'échantillon avant de procéder à l'analyse de ce dernier par le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Un mélange réactionnel témoin supplémentaire (Ctrl) est fourni pour déterminer si la valeur de  $C_T$  est acceptable pour le test. Les valeurs d'absorbance ne doivent pas être utilisées car elles ne correspondent pas aux valeurs de  $C_T$  des échantillons d'ADN fragmenté.

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

## Caractéristiques des performances

### Seuils

171 échantillons FFPE ont été testés à l'aide d'une méthode conforme aux directives du NCCLS EP17-A (2004). Les données de 159 échantillons ont été utilisées pour établir des seuils pour le kit. L'intervalle  $C_T$  de la réaction du témoin a été établi entre 23,00 et 30,69  $C_T$ . Les valeurs seuil ont été établies et sont présentées dans le tableau 8.

### Limite de détection (LoD)

Pour déterminer la LoD du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, un ensemble d'échantillons a été développé en mélangeant de l'ADN mutant synthétique avec de l'ADN génomique de type sauvage afin de simuler un intervalle de pourcentages de mutation pour chacune des 29 mutations. La LoD de chaque test est définie comme la mutation en pourcentage à laquelle 95 % des réplicats ont été déterminés comme positifs par le kit *therascreen* EGFR PCR RGQ. Les valeurs de la LoD sont indiquées dans le Tableau 9. Pour les tests multiples, qui détectent plusieurs mutations (G719X, délétions et insertions), la valeur indiquée est celle de la réaction qui donne la LoD la plus élevée.

**Tableau 9. LoD pour chacun des sept tests de mutation d'EGFR**

Mutation	Mutation détectable en pourcentage (%)
T790M	7,02
Délétions	1,64
L858R	1,26
L861Q	0,50
G719X	5,43
S768I	1,37
Insertions	2,03

## Précision

Pour déterminer la précision du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, un ensemble d'échantillons a été développé en mélangeant de l'ADN mutant synthétique avec de l'ADN génomique de type sauvage afin de simuler un faible pourcentage de mutation pour chacun des sept tests de mutation. La précision a été évaluée en testant des échantillons sur un site de test, à l'aide de plusieurs lots de kits, en faisant intervenir plusieurs opérateurs et ce sur plusieurs jours, avec deux réplicats de chaque échantillon. La variation constatée, en termes d'écart-type estimé par rapport à l'analyse de composante de variance, était inférieure à 1  $\Delta C_T$  et peut être utilisée comme estimation de la précision (Tableau 10).

**Tableau 10. Résultats des tests en laboratoire\***

Test	Pourcentage de tests avec résultat de mutation positif	Écart-type estimé ( $\Delta C_T$ )
T790M	100 %	0,33
Délétions	100 %	0,40
L858R	100 %	0,45
L861Q	100 %	0,49
G719X	97,9 %	0,59
S768I	97,9 %	0,31
Insertions	97,9 %	0,38

\* Chaque mutation a été testée sur 93 réplicats.

## Reproductibilité

La reproductibilité a été évaluée en testant les échantillons présentant une mutation de niveau élevé dans le bruit de fond d'un ADN génomique de type sauvage sur trois sites de test, à l'aide de plusieurs lots de kit, en faisant intervenir plusieurs opérateurs et analyses sur plusieurs jours, avec deux réplicats de chaque échantillon. Pour chacun des sept tests de mutation, entre 96,1 et 100 % des échantillons d'ADN mutants ont donné un résultat de mutation positif. Les échantillons de type sauvage ont donné un résultat de mutation négatif dans tous les tests et sur tous les sites.

## Effet de la concentration d'ADN d'entrée

Pour déterminer l'effet de la modification de la concentration d'ADN d'entrée sur les résultats produits par le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR proches de la LoD, un ensemble d'échantillons a été développé pour chacune des 29 mutations, en mélangeant de l'ADN mutant synthétique avec de l'ADN génomique de type sauvage pour produire des échantillons présentant des niveaux totaux faibles, moyens et élevés d'ADN d'entrée.

Les niveaux faibles et élevés d'ADN d'entrée ont été ciblés pour représenter l'intervalle de valeurs  $C_T$  du test témoin (23,50 à 29,50).

Une évaluation de l'ensemble des données de l'ADN d'entrée (29 mutations, à des concentrations proches de la LoD et à trois niveaux d'ADN d'entrée différents) ont révélé un taux de mutation positive de 95,44 %.

Ces données indiquent que la variation du niveau de l'ADN d'entrée, au sein de l'intervalle de fonctionnement du test, n'a pas d'influence sur la valeur  $\Delta C_T$  ou sur la détection d'une mutation d'un échantillon.

## Substances interférentes

L'effet potentiel sur les performances des composants du kit QIAGEN® QIAamp DNA FFPE Tissue lors du traitement des échantillons FFPE a été évalué.

Le formaldéhyde, la cire de paraffine, le xylène, l'éthanol, le tampon ATL, la protéinase K, le tampon AL et les tampons de lavage AW1 et AW2 ont été utilisés aux taux de concentration les plus élevés prévus (« pire scénario ») (en supposant que chaque étape de lavage ou de purification du protocole du kit d'extraction ait entraîné une réduction de la concentration des composants de 1 log).

L'étude a utilisé des échantillons trois fois LoD plutôt qu'un niveau de mutation beaucoup plus élevé, afin de garantir la détection d'interférences potentielles.

Une différence dans la valeur  $\Delta C_T$  de 3 écarts-types ou moins (à partir de l'étude de précision) entre le « test » et le « témoin » (pas de substance interférente) a été interprétée comme indiquant une interférence potentielle.

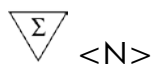
Aucune des substances interférentes potentielles évaluées n'a présenté une variation de la valeur  $\Delta C_T$  d'1 écart-type ou plus comparée aux témoins.

## Références

QIAGEN tient à jour une grande base de données en ligne de publications scientifiques utilisant les produits QIAGEN. Des critères de sélection de recherche vous aident à trouver les articles dont vous avez besoin à l'aide d'un simple mot-clé ou en spécifiant l'application, le domaine de recherche, le titre, etc.

Pour une liste complète des références, visiter la base de données de référence QIAGEN à l'adresse [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) ou contacter les services techniques de QIAGEN ou votre distributeur local.

## Symboles



Contient des réactifs pour <N> tests



À utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*



Numéro de référence



Numéro de lot



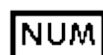
Numéro de matériel



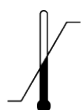
Composants



Contient



Nombre



Limite de température



Fabricant



Consulter les instructions d'utilisation

## Coordonnées

Pour obtenir une assistance technique et plus d'informations, prière de consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), de téléphoner au 00800-22-44-6000 ou de contacter l'un des services techniques de QIAGEN ou l'un des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Annexe : informations concernant la mutation

Les identifiants COSMIC sont tirés du *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (catalogue des mutations somatiques associées au cancer, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>).

**Tableau 11. Liste des mutations et des identifiants COSMIC.**

Mutation	Exon	Changement de base	ID COSMIC
<b>T790M</b>	20	2369C>T	6240
<b>L858R</b>	21	2573T>G	6224
<b>L861Q</b>	21	2582T>A	6213
<b>S768I</b>	20	2303G>T	6241
<b>G719A</b>	18	2156G>C	6239
<b>G719S</b>	18	2155G>A	6252
<b>G719C</b>	18	2155G>T	6253
<b>Insertions</b>	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
<b>Délétions</b>	19	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
		2238_2252>GCA (complexe)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254

**Tableau 11. Liste des mutations et des identifiants COSMIC (suite)**

<b>Mutation</b>	<b>Exon</b>	<b>Changement de base</b>	<b>ID COSMIC</b>
<b>Délétions</b>	19	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	Contenu	N° réf.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Pour 24 réactions : 1 test témoin, 7 tests de mutation, témoin positif, Taq ADN polymérase	870111
<b>Rotor-Gene Q et ses accessoires</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Instrument de PCR en temps réel et analyseur de fusion 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	Instrument de PCR en temps réel et analyseur de fusion 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	9002032
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Instrument de PCR en temps réel et analyseur de fusion 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	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Instrument de PCR en temps réel et analyseur de fusion 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	9001580
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloc en aluminium pour préparation de réaction manuelle avec pipette à canal unique dans des tubes de 72 x 0,1 mL	9018901



Produit	Contenu	N° réf.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 barrettes de 4 tubes et capuchons pour 1 000 réactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 barrettes de 4 tubes et capuchons pour 10 000 réactions	981106

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](http://www.qiagen.com) ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

Cette page est intentionnellement laissée vierge

L'achat de ce produit permet à l'acquéreur de l'utiliser afin d'effectuer des diagnostics *in vitro* humains. Aucun brevet ou licence de toute sorte autre que ce droit d'utilisation spécifique après achat n'est accordé par la présente.

Marques déposées : QIAGEN®, QIAamp®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ARMS® (AstraZeneca Limited); FAM™, HEX™ (Life Technologies, Inc.).

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR est un kit de diagnostic certifié CE conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux diagnostics *in vitro*. Disponible uniquement dans certains pays.

#### **Accord de licence limitée pour le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR**

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

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, 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](http://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 kit et/ou son ou ses utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont octroyés 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 kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les termes précédents. QIAGEN est susceptible de 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 du présent Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2012–2013 QIAGEN, tous droits réservés.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Canada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

**Korea (South)** ■ techservice-kr@qiagen.com

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

