

Manuel du kit *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR



Version 1

IVD

Diagnostic quantitatif *in vitro*

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



REF

874011



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House,
Lloyd Street North, Manchester, M15 6SH, Royaume-Uni

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, ALLEMAGNE

R4 MAT

1116068FR



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**.

Contenu

Utilisation prévue	5
Résumé et explication	5
Principe de la procédure	7
Matériel fourni	10
Contenu du kit	10
Matériel nécessaire mais non fourni	11
Avertissements et précautions	12
Informations de sécurité	12
Précautions générales	12
Stockage et manipulation des réactifs	13
Prélèvement d'échantillons, préparation à l'analyse et stockage	14
Procédure	15
Extraction d'ADN	15
Protocole : évaluation des échantillons d'ADN	16
Protocole : détection des mutations KRAS	30
Interprétation des résultats	39
Guide de dépannage	40
Avertissements générés par le logiciel <i>therascreen</i> KRAS Assay Package	41
Contrôle qualité	49
Limitations	49
Caractéristiques des performances	50
Performances analytiques	50
Limite de détection (LoD)	56
Entrée d'ADN et linéarité	58
Substances interférentes	63
Contamination croisée	63
Exclusivité/réactivité croisée	64
Répétabilité et reproductibilité	66
Variabilité liée à la manipulation des échantillons	69

Équivalence des méthodes d'acquisition des échantillons (CPNPC uniquement)	70
Références	71
Symboles	74
Coordonnées	75
Annexe 1 : Protocole manuel du kit <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR	76
Interprétation des résultats (manuelle)	89
Paramètres d'analyse du logiciel	89
Analyse des données d'évaluation de l'échantillon	90
Analyse de la détection des mutations KRAS	91
Analyse des échantillons	93
Annexe 2 : Installation du logiciel <i>therascreen</i> KRAS Assay Package	98
Pour commander	101
Historique des révisions	102

Utilisation prévue

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR est un test de PCR qualitative en temps réel utilisé pour détecter 7 mutations somatiques dans les codons 12 et 13 de l'oncogène KRAS humain, à l'aide de l'instrument Rotor-Gene Q MDx. Le kit est destiné à être utilisé avec l'ADN extrait de tissu fixé au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE) de cancer colorectal (CRC) ou de tissu de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) acquis par résection, biopsie au trocart (BAT) ou aspiration à l'aiguille fine (BAAF).

Les mutations somatiques dans le gène KRAS sont des biomarqueurs potentiellement prédictifs de la résistance aux thérapies ciblées sur le facteur de croissance épidermique humain (EGFR), telles que le panitumumab et le cetuximab pour le traitement du CRC. Les mutations somatiques dans le gène KRAS peuvent également être indiquées comme étant des biomarqueurs potentiellement prédictifs pour la prise de décisions concernant le traitement dans le cas de certaines thérapies du CPNPC.

L'état mutationnel d'un patient sera pris en compte par le clinicien parallèlement à d'autres facteurs pathologiques avant de déterminer la thérapie à suivre. Aucune décision relative au traitement des patients atteints de cancer ne doit s'appuyer uniquement sur l'état mutationnel du gène KRAS.

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR n'est pas conçu pour diagnostiquer le CRC, le CPNPC ni aucune autre maladie.

Résumé et explication

Les mutations de l'oncogène KRAS apparaissent fréquemment dans les cancers humains (1-4). Grâce aux technologies Scorpions® et ARMS® (système de mutation réfractaire par amplification) (5, 6), le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR permet de détecter, dans un bruit de fond d'ADN génomique de type sauvage, 7 mutations dans les codons 12 et 13 de l'oncogène KRAS (tableau 1). D'après les données de la base COSMIC (2015 v72), les 7 mutations détectées par le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR représentent plus de 95 % de l'ensemble des mutations KRAS rapportées chez les patients atteints de CRC et plus de 88 % de l'ensemble des mutations rapportées chez les patients atteints de CPNPC (7).

Tableau 1. Liste des mutations et des identifiants COSMIC

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

* Les identifiants COSMIC sont tirés du *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (7) (catalogue des mutations somatiques associées au cancer, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Le test, très spécifique et sensible, permet la détection d'un faible pourcentage d'ADN mutant dans le bruit de fond d'un ADN de type sauvage. À condition qu'il y ait suffisamment de copies d'ADN, la détection de 0,8 % de mutants dans le bruit de fond d'un ADN génomique de type sauvage est possible (pour de plus amples informations sur la limite de détection pour chaque mutation, voir « Caractéristiques des performances », page 50).

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR est utilisé dans le cadre d'une procédure de réaction en chaîne par polymérase (PCR). Le kit présente l'avantage d'être hautement spécifique à la cible, rapide et efficace et de garantir l'absence de subjectivité dans la détermination des résultats.

Principe de la procédure

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR utilise 2 technologies (ARMS et Scorpions) pour détecter les mutations dans les PCR en temps réel.

Mélanges réactionnels de mutation

Chaque mélange réactionnel de mutation utilise une amorce ARMS spécifique à la mutation pour amplifier de façon sélective l'ADN ayant subi une mutation, puis une amorce Scorpions pour détecter le produit de l'amplification.

ARMS

L'amplification spécifique d'allèle s'effectue par le biais du système ARMS (système de mutation réfractaire par amplification), qui exploite la capacité de la *Taq* ADN polymérase à établir une distinction entre un appariement et un mésappariement à l'extrémité 3' d'une amorce de PCR. 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 se produit. Une séquence mutée est alors sélectionnée pour être amplifiée, même pour des échantillons où la majorité de l'ADN ne contient pas la mutation.

Scorpions

La détection de l'amplification s'effectue par le biais de la technologie Scorpions. Les Scorpions sont des molécules bi-fonctionnelles contenant une amorce de PCR qui comporte une liaison covalente avec une sonde. La sonde intègre la carboxyfluorescéine (fluorophore noté FAM™) et un quencher. Ce dernier diminue la fluorescence du fluorophore. Lorsque la sonde s'hybride à l'amplicon ARMS au cours de la PCR, le fluorophore et le quencher se séparent, entraînant une augmentation détectable de la fluorescence.

Format du kit

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR contient 8 tests :

- 1 test de contrôle (mélange réactionnel de contrôle ; CTRL)
- 7 tests de mutation (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

Les mélanges réactionnels sont doubles et contiennent des réactifs marqués FAM pour détecter les cibles, ainsi qu'un contrôle interne marqué HEX™. Les mélanges réactionnels et les réactifs de contrôles positifs contiennent un tampon Tris EDTA, et le contrôle positif contient l'ARN porteur polyadénylé.

Tests

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR comporte une procédure en 2 étapes. Lors de la première étape, le test de contrôle est effectué afin d'évaluer l'ADN KRAS amplifiable total d'un échantillon. Lors de la seconde étape, le test de mutation et le test de contrôle sont effectués pour déterminer la présence ou non d'ADN mutant.

Réaction de contrôle

Le mélange réactionnel de contrôle (CTRL) utilise une amorce Scorpions et une amorce non marquée pour amplifier une courte séquence de l'exon 4 du gène KRAS. La réaction de contrôle détermine si un niveau approprié d'ADN amplifiable est présent dans l'échantillon et constitue un facteur utilisé dans les calculs analytiques servant à déterminer l'état mutationnel.

Test de contrôle

Le test de contrôle, marqué FAM, est utilisé afin d'évaluer l'ADN KRAS amplifiable total d'un échantillon. Le test de contrôle amplifie une région de l'exon 4 du gène KRAS. Les amorces et la sonde Scorpions sont conçues de façon à amplifier indépendamment de tout polymorphisme connu du gène KRAS.

Tests de mutation

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

Contrôles

Remarque : toutes les analyses de contrôle doivent inclure des contrôles positifs et négatifs.

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 un résultat inexact 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. Cependant, il est à noter que cela entraîne également une dilution de l'ADN cible. Un tube d'eau pour dilution de l'échantillon (Dil.) est fourni avec le kit.

La dilution des échantillons doit être effectuée avec l'eau pour dilution de l'échantillon (Dil.).

Contrôle positif

Chaque analyse doit contenir un contrôle positif dans les tubes 1 à 5. Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR contient un contrôle positif (PC) KRAS à utiliser en tant que matrice dans la réaction du contrôle positif. Les résultats du contrôle positif sont évalués pour garantir que le kit fonctionne conformément aux critères d'acceptation donnés.

Contrôle négatif

Chaque analyse doit contenir un contrôle négatif (« No Template Control », NTC) dans les tubes 9 à 13. Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR contient de l'eau pour le contrôle négatif (NTC) à utiliser en tant que « matrice » pour le contrôle négatif. Le contrôle négatif est utilisé pour évaluer toute contamination potentielle durant la configuration de l'analyse et pour évaluer les performances de la réaction du contrôle interne.

Évaluation de l'échantillon

Le mélange réactionnel de contrôle (CTRL) fourni avec le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR est utilisé pour évaluer l'ADN KRAS amplifiable total présent dans un échantillon. Le test de contrôle amplifie une région de l'exon 4 du gène KRAS. Il est recommandé de préparer les échantillons uniquement avec le test de contrôle, en utilisant le contrôle positif KRAS (PC) comme contrôle positif et de l'eau pour le NTC (No Template Control) comme contrôle négatif.

Plate-forme et logiciel

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR est spécialement conçu pour une utilisation avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx. Le logiciel Rotor-Gene Q et le logiciel *therascreen* KRAS Assay Package sont disponibles au téléchargement sur Internet ou séparément sur CD.

Les instruments Rotor-Gene Q MDx doivent être entretenus conformément aux exigences du manuel de l'utilisateur de l'instrument. Consulter le manuel de l'utilisateur pour toute information concernant l'instrument.

Voir « Annexe 2 : Installation du logiciel *therascreen* KRAS Assay Package », page 98 pour les instructions d'installation.

Matériel fourni

Contenu du kit

therascreen KRAS RGQ PCR Kit				(24)
N° de référence				874011
Nombre de préparations				24
Couleur	Désignation	Identification du tube		Volume
Rouge	Control Reaction Mix (mélange réactionnel de contrôle)	1	CTRL	2 × 600 µl
Violet	12ALA Reaction Mix (mélange réactionnel 12ALA)	2	12ALA	600 µl
Orange	12ASP Reaction Mix (mélange réactionnel 12ASP)	3	12ASP	600 µl
Rose	12ARG Reaction Mix (mélange réactionnel 12ARG)	4	12ARG	600 µl
Vert	12CYS Reaction Mix (mélange réactionnel 12CYS)	5	12CYS	600 µl
Jaune	12SER Reaction Mix (mélange réactionnel 12SER)	6	12SER	600 µl
Gris	12VAL Reaction Mix (mélange réactionnel 12VAL)	7	12VAL	600 µl
Bleu	13ASP Reaction Mix (mélange réactionnel 13ASP)	8	13ASP	600 µl
Beige	KRAS Positive Control (contrôle positif KRAS)	9	PC	250 µl
Menthe	Taq DNA Polymerase (Taq ADN polymérase)		Taq	80 µl
Blanc	Water for NTC (eau pour NTC)		NTC	1,9 ml
Blanc	Water for Sample Dilution (eau pour dilution de l'échantillon)		Dil.	1,9 ml
therascreen KRAS 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.

Réactifs

- QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (n° de réf. 56404 ; voir « Extraction d'ADN », page 15)
- Xylène
- Éthanol (96-100 %) *

Consommables

- Pointes de pipette stériles avec filtres (pour éviter la contamination croisée, nous recommandons des pointes de pipette avec des filtres anti-aérosols)
- Tubes de microcentrifugeuse stériles pour la préparation des master mix
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (barrettes de tubes et de capuchons de 0,1 ml) à utiliser avec un rotor de 72 puits (n° de réf. 981103 ou 981106)

Équipement

- Instrument Rotor-Gene Q MDx avec canaux de fluorescence pour Cycling Green et Cycling Yellow (pour détecter FAM et HEX, respectivement) *
- Logiciel Rotor-Gene Q version 2.3 avec KRAS Assay Package (version 3.1.1) installé pour la détection automatique de mutations (voir « Annexe 2 : Installation du logiciel *therascreen* KRAS Assay Package », page 98)

Remarque : le logiciel Rotor-Gene Q peut être utilisé sans KRAS Assay Package pour la détection manuelle de mutations. Voir « Annexe 1 : Protocole manuel du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR », page 76.

- Thermomixeur[†], incubateur orbital chauffé, bloc chauffant ou bain-marie capable d'incuber à 56 °C et 90 °C
- Centrifugeuse de paillasse[†] avec rotor pour tube de 1,5 ml

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

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

- Agitateur de paillasse*
- 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*

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** répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.

Précautions générales

L'utilisateur doit toujours faire attention aux éléments suivants :

- Conserver et procéder à l'extraction du matériel positif (prélèvements et contrôles positifs) séparément de tous les autres réactifs puis les ajouter au mélange réactionnel dans un emplacement suffisamment distant.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination des PCR avec le matériel de contrôle 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.
- Les réactifs du kit *therascreen* KRAS 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 de résultats faux négatifs.

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

- Tous les réactifs du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR ont été spécifiquement formulés pour une performance optimale. Tous les réactifs fournis dans le kit sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans le même kit *therascreen* KRAS RGQ PCR. Afin de garantir des performances optimales, les réactifs de ce kit ne doivent pas être remplacés.
- 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 ni par de la *Taq* ADN polymérase d'un autre fournisseur.

Stockage et manipulation des réactifs

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR est expédié sur un lit de glace sèche. Si un des composants du kit *therascreen* KRAS 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 de support technique ou l'un des distributeurs locaux de QIAGEN (voir quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com).

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR doit être stocké dès réception à une température comprise entre -30 °C et -15 °C dans un congélateur à température constante et à l'abri de la lumière. Tout comme toutes les molécules marquées en fluorescence, les molécules Scorpions doivent être protégées de la lumière pour éviter tout photoblanchiment ou toute perte de performances.

Lorsqu'il est stocké dans les conditions de conservation recommandées dans son emballage d'origine, le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR est stable jusqu'à la date de péremption indiquée. Éviter la congélation et décongélation à répétition. Ne pas dépasser un maximum de 6 cycles de congélation/décongélation.

Prélèvement d'échantillons, préparation à l'analyse et stockage

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 de tissu FFPE. Les échantillons doivent être transportés conformément à la méthodologie standard de pathologie pour garantir leur bonne qualité.

Les échantillons tumoraux sont hétérogènes 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 détectées par le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR.

Préparation des échantillons de tissu

Remarque : utiliser des scalpels secs. Ne pas effectuer cette étape dans une hotte de laboratoire ou à flux d'air laminaire.

- Gratter le tissu tumoral des coupes et le placer dans des tubes de microcentrifugeuse marqués. Utiliser un nouveau scalpel pour chaque échantillon.

Préparation des échantillons de tissu à l'extraction d'ADN (CRC)

- À l'aide de méthodes et de matériel standard, fixer le prélèvement de tissu à 10 % de formaldéhyde neutre tamponné et l'inclure en paraffine. À l'aide d'un microtome, faire des coupes sériées de 5 µm dans le bloc de paraffine et les placer sur des lames en verre.
- Un professionnel expérimenté (par ex. un pathologiste) doit évaluer une coupe colorée à l'hématoxyline-éosine afin d'y déceler un contenu tumoral et d'en déterminer la surface. Marquer la lame colorée pour distinguer le tissu tumoral du tissu sain. Utiliser les coupes sériées pour l'extraction d'ADN.
- Utiliser des coupes comportant plus de 20 % de contenu tumoral par zone pour un traitement sans macro-dissection (voir ci-dessous).
- Pour les coupes contenant moins de 20 % de contenu tumoral par zone, effectuer une macro-dissection d'une ou plusieurs coupes. Éliminer le tissu non tumoral.

- Pour les coupes dont la surface est inférieure à 4 mm², traiter deux ou trois coupes pour augmenter la zone tumorale totale afin qu'elle atteigne 4 mm² (s'applique aux échantillons avec et sans macro-dissection). Éliminer le tissu non tumoral.
- Nettoyer l'excédent de paraffine du tissu en grattant avec un scalpel stérile.

Préparation des échantillons de tissu à l'extraction d'ADN (CPNPC)

- À l'aide de méthodes et de matériel standard, fixer l'échantillon de tissu à 10 % de formaldéhyde neutre tamponné et l'inclure en paraffine. À l'aide d'un microtome, faire des coupes sériées de 5 µm dans le bloc de paraffine et les placer sur des lames en verre.
- Un professionnel expérimenté (par ex. un pathologiste) doit évaluer une coupe colorée à l'hématoxyline-éosine afin d'y déceler un contenu tumoral. Utiliser les coupes sériées pour l'extraction d'ADN.
- Nettoyer l'excédent de paraffine du tissu en grattant avec un scalpel stérile.

Conservation

Conserver les blocs et lames FFPE à température ambiante. Les lames peuvent être conservées à température ambiante jusqu'à 4 semaines avant l'extraction d'ADN.

L'ADN génomique peut être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant la semaine suivant l'extraction, puis à une température comprise entre -25 et -15 °C jusqu'à 8 semaines avant utilisation.

Procédure

Extraction d'ADN

Les caractéristiques de performances du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR ont été générées à l'aide d'ADN extrait avec le kit QIAamp DNA FFPE Tissue (n° de réf. 56404). En cas d'utilisation du kit QIAamp DNA FFPE Tissue, procéder à l'extraction de l'ADN conformément aux instructions du manuel en prenant en compte les remarques suivantes.

Extraction de l'ADN (échantillons de CRC)

- Le kit QIAamp DNA FFPE Tissue doit être utilisé manuellement uniquement.
- Ne pas effectuer l'étape de RNase décrite dans le manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*).

- Ne pas utiliser de solution de déparaffinisation QIAGEN. Pour la déparaffinisation, utiliser uniquement la méthode au xylène ou à l'éthanol décrite dans le manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue.
- La digestion de la protéinase K (étape 11 du manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue) doit être effectuée pendant 1 heure.
- Les échantillons doivent être élués dans 200 µl de tampon d'éluion (tampon ATE) du kit QIAamp DNA FFPE Tissue.

Extraction de l'ADN (échantillons de CPNPC)

- Utiliser 2 sections de 5 µm par extraction.
- Le kit QIAamp DNA FFPE Tissue doit être utilisé manuellement uniquement.
- Ne pas effectuer l'étape de RNase décrite dans le manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*).
- Ne pas utiliser la solution de déparaffinisation QIAGEN du kit QIAamp DNA FFPE Tissue. Pour la déparaffinisation, utiliser uniquement la méthode au xylène ou à l'éthanol décrite dans le manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue.
- La digestion de la protéinase K (étape 11 du manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue) doit être effectuée pendant 1 heure.
- Ajouter 60 µl de tampon d'éluion (ATE) du kit QIAamp DNA FFPE Tissue et incubé pendant 2,5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à pleine vitesse pendant 1 minute.
- Ajouter à nouveau 60 µl de tampon d'éluion (ATE) du kit QIAamp DNA FFPE Tissue et incubé pendant 2,5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à pleine vitesse pendant 1 minute.

Protocole : évaluation des échantillons d'ADN

Ce protocole est utilisé pour évaluer l'ADN total amplifiable dans les échantillons à l'aide du modèle KRAS CE Sample Assessment Locked Template (Assay Package) pour l'évaluation automatisée des échantillons.

Remarque : pour l'évaluation manuelle des échantillons, voir « Annexe 1 : Protocole manuel du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR », page 76.

Points importants avant de commencer

- Le mélange réactionnel de contrôle (CTRL) disponible permet d'évaluer un maximum de 24 échantillons.
- Utiliser le mélange réactionnel de contrôle (CTRL) pour évaluer l'ADN avant le test.
- **Remarque** : il est important d'utiliser le mélange réactionnel de contrôle (CTRL) comme décrit ci-dessous pour cette évaluation et non la spectrophotométrie ou toute autre méthode. L'ADN fortement dégradé peut ne pas s'amplifier, même si les amorces génèrent de courts fragments d'ADN.
- Pour une utilisation efficace des réactifs du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR, regrouper au maximum les échantillons d'ADN pour créer des analyses complètes. Tester les échantillons individuellement ou par petits groupes consomme plus de réactifs et réduit la quantité totale d'échantillons pouvant être testés avec un seul kit *therascreen* KRAS RGQ PCR.
- Avant la première utilisation de l'instrument Rotor-Gene Q MDx, s'assurer que le logiciel *therascreen* KRAS Assay Package correct correspondant à la version du logiciel Rotor-Gene Q est installé (voir « Annexe 2 : Installation du logiciel *therascreen* KRAS Assay Package », page 98).

Procédure

1. **Décongeler complètement le mélange réactionnel de contrôle (CTRL), l'eau sans nucléase pour le NTC et le contrôle positif (PC) KRAS à température ambiante (entre 15 et 30 °C) pendant au moins une heure.**

- **Remarque** : porter la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) à température ambiante (15 à 30 °C) en même temps que les autres réactifs (voir « Stockage et manipulation des réactifs », page 13). Passer brièvement le tube à la centrifugeuse pour pouvoir prélever l'enzyme au fond du tube.

Les durées de décongélation des réactifs, de préparation de la PCR et de stockage avant le début de l'analyse sont indiquées dans le tableau 2.

Remarque : effectuer la configuration de la PCR à température ambiante.

Tableau 2. Temps de décongélation, temps de configuration de la PCR et températures de stockage

Temps de décongélation		Température de stockage* après configuration de la PCR	Durée maximale de préparation et de stockage de la PCR
Minimum	Maximum		
1 heure	4,5 heures	Température ambiante (15 à 30 °C)	7 heures
1 heure	4,5 heures	2 à 8 °C	18 heures

* Le terme « stockage » désigne la durée entre l'achèvement de la configuration de la PCR et le début de l'analyse par PCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

- 1. Mélanger les réactifs décongelés 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.**

Remarque : ne pas faire passer la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) ou tout autre mélange contenant de la *Taq* dans l'agitateur : l'enzyme risquerait d'être désactivée.

- 2. Préparer suffisamment de master mix (mélange réactionnel de contrôle [CTRL] plus *Taq* ADN polymérase [*Taq*]) en respectant les volumes indiqués dans le Tableau 3 pour :**
 - tous les échantillons d'ADN
 - 1 réaction de contrôle positif (PC) KRAS
 - 1 eau sans nucléase pour la réaction du contrôle négatif (NTC)
 - 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 du master mix du test de contrôle

Composant	Volume
Mélange réactionnel de contrôle (CTRL)	$19,76 \mu\text{l} \times (n + 1)^*$
<i>Taq</i> ADN polymérase (<i>Taq</i>)	$0,24 \mu\text{l} \times (n + 1)^*$
Volume total	20 μl/réaction

* n = nombre de réactions (échantillons plus contrôles).

Préparer suffisamment de master mix pour 1 échantillon supplémentaire (n + 1) afin de disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR.

La valeur de n ne doit pas dépasser 24 (plus les contrôles), 24 étant le nombre maximum d'échantillons pour une analyse.

Remarque : lors de la préparation du master mix, le volume nécessaire de mélange réactionnel de contrôle (CTRL) est ajouté en premier au tube correspondant et la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) est ajoutée en dernier.

Remarque : pipeter la *Taq* ADN polymérase en plaçant avec précaution 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.

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

Remarque : laisser les bouchons dans le conteneur en plastique le temps nécessaire.

Tableau 4. Agencement de l'analyse pour l'évaluation des échantillons d'ADN dans le bloc de chargement

Test									
Contrôle	1 (PC)	9	17	25	–	–	–	–	–
Contrôle	2 (NTC)	10	18	26	–	–	–	–	–
Contrôle	3	11	19	–	–	–	–	–	–
Contrôle	4	12	20	–	–	–	–	–	–
Contrôle	5	13	21	–	–	–	–	–	–
Contrôle	6	14	22	–	–	–	–	–	–
Contrôle	7	15	23	–	–	–	–	–	–
Contrôle	8	16	24	–	–	–	–	–	–

* Les chiffres indiquent les positions dans le bloc de chargement et la position finale dans le rotor.

4. Remplir une pipette à un volume inférieur au volume total du mélange réactionnel et mélanger soigneusement en aspirant 10 fois vers le haut et vers le bas.
5. Ajouter immédiatement 20 µl de master mix dans chaque tube de PCR.
Remarque : se reporter au tableau 4 pour la disposition des tubes. Pour l'évaluation des échantillons d'ADN, le master mix du test de contrôle doit être ajouté à un tube PC, un tube NTC et un tube pour chaque échantillon d'ADN.
6. Ajouter immédiatement 5 µl d'eau sans nucléase pour le contrôle négatif (NTC) au tube NTC (position de tube 2) et boucher le tube.
7. Ajouter 5 µl de chaque échantillon d'ADN aux tubes d'échantillon (positions de tubes 3 à 26) et boucher les tubes.
8. Ajouter 5 µl de contrôle positif KRAS (PC) au tube de PC (position de tube 1) et boucher le tube.

Chaque tube doit contenir un volume réactionnel total de 25 µl (20 µl de master mix préparé selon le tableau 3, plus 5 µl de NTC/échantillon/PC).

9. À l'aide d'un marqueur permanent, identifier le couvercle des tubes se trouvant dans les positions numériques les plus faibles pour chaque barrette de 4 tubes de PCR (par ex. positions 1, 5 et 9, etc.) pour indiquer l'orientation de chargement des tubes dans le rotor à 72 puits de l'instrument Rotor-Gene Q MDx.
10. Retourner 4 fois les tubes bouchés pour mélanger l'échantillon et le mélange réactionnel.
11. Placer toutes les barrettes de 4 tubes de PCR dans les positions appropriées du rotor à 72 puits selon l'agencement de l'analyse (tableau 4) en s'aidant des marques pour une bonne orientation.
Remarque : si le rotor n'est pas complètement rempli, placer dans toutes les positions non utilisées un tube vide bouché. Cela permet de maintenir l'efficacité thermique de l'instrument Rotor-Gene Q MDx.
12. Placer le rotor de 72 puits dans l'instrument Rotor-Gene Q MDx. S'assurer que la bague de fermeture (fournie avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx) est placée au-dessus du rotor pour que les tubes ne bougent pas lors de l'analyse.
13. Lancer le logiciel Rotor-Gene Q et ouvrir le modèle en même temps en double-cliquant sur l'icône « **therascreen KRAS QC Locked Template** » située sur le bureau de l'ordinateur portable connecté à l'instrument Rotor-Gene Q MDx (figure 1).



Figure 1. Icône « **therascreen KRAS QC Locked Template** ».

14. L'onglet « Setup » (configuration) s'affiche par défaut (figure 2). S'assurer que la bague de fermeture est correctement fixée et cocher la case « Locking Ring Attached » (bague de fermeture fixée). Fermer le couvercle de l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

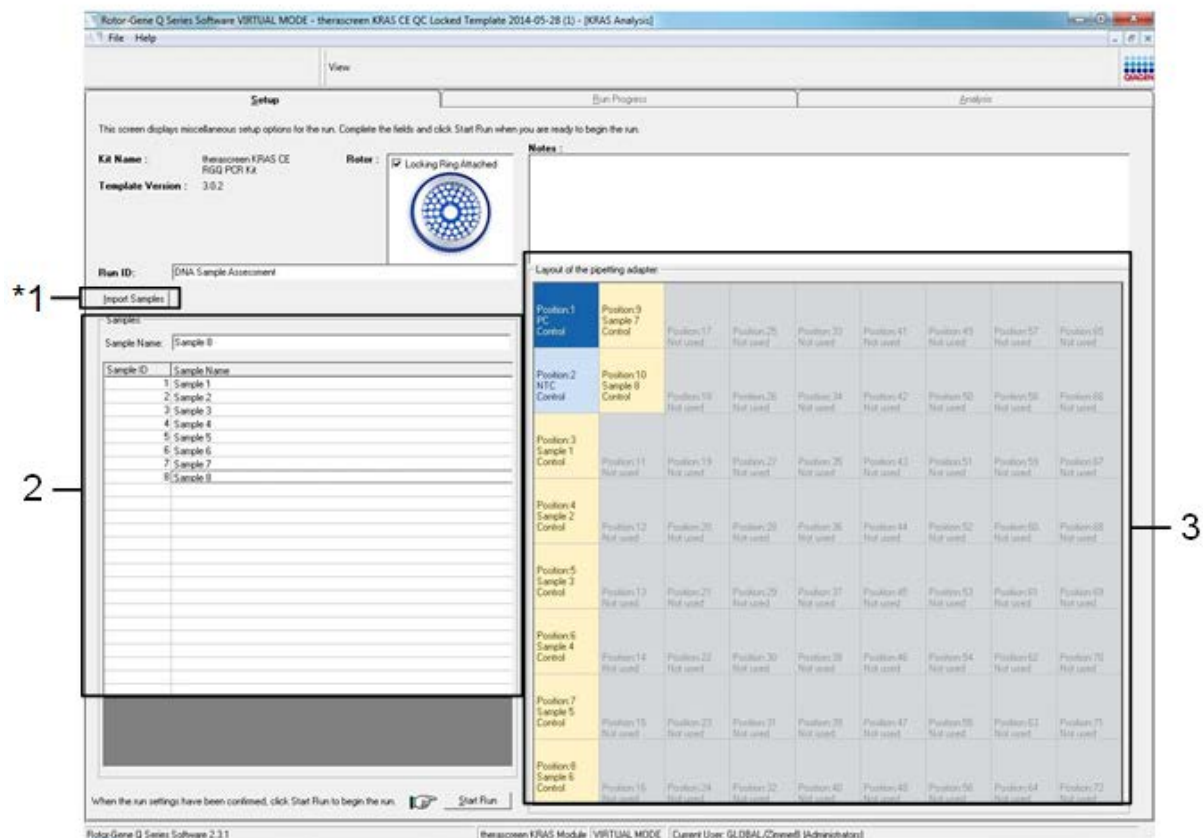


Figure 2. Onglet « Setup » (configuration) et case « Locking Ring Attached » (bague de fermeture fixée). 1 = onglet « Setup » (configuration), 2 = case « Locking Ring Attached » (bague de fermeture fixée).

15. Entrer l'identifiant de l'analyse dans le champ « Run ID » (identifiant d'analyse) selon la nomenclature locale. Entrer le nom de l'échantillon dans le champ « Sample Name » (nom d'échantillon) selon la nomenclature locale et appuyer sur Entrée.

Le nom de l'échantillon est alors ajouté à la liste d'échantillons au-dessous et l'échantillon se voit attribuer un « Sample ID » (ID échantillon) : 1, 2, 3, etc. En outre, le panneau « Layout of the pipetting adapter » (agencement de l'adaptateur de pipette) sur la droite est mis à jour pour afficher le nom de l'échantillon (figure 3).

il est également possible d'importer les noms d'échantillons enregistrés au format *.smp (fichier échantillon Rotor-Gene Q) ou *.csv (comma-separated values, valeurs séparées par des virgules) avec le bouton « Import Samples » (importer des échantillons). Les noms d'échantillons seront automatiquement renseignés avec cette méthode.

Remarque : dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (agencement de l'adaptateur de pipette), vérifier que l'ajout du nom de l'échantillon est mis en évidence par un changement de couleur et que le nom de l'échantillon se trouve à l'emplacement correspondant (figure 3).

Remarque : les noms d'échantillons comportant plus de 8 caractères ne s'affichent pas entièrement dans le panneau « Layout of the pipetting adapter ».

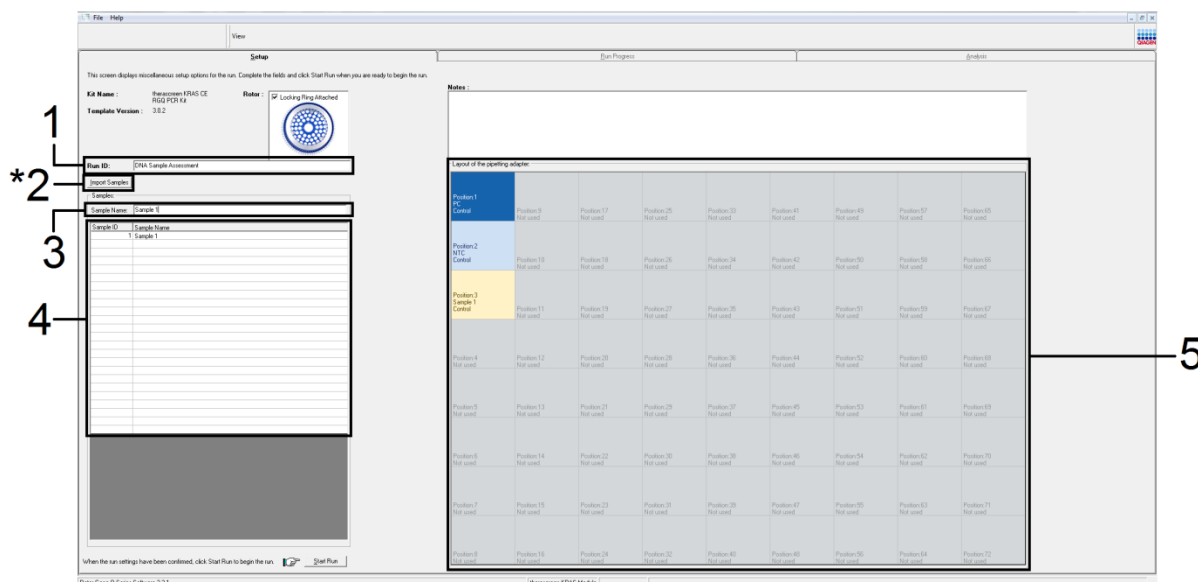


Figure 3. Saisie de l'identifiant d'analyse et du nom d'échantillon. 1 = champ « Run ID » (identifiant d'analyse), 2 = bouton « Import Sample » (importer un échantillon), 3 = champ « Sample Name » (nom de l'échantillon), 4 = Liste d'échantillons, 5 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (agencement de l'adaptateur de pipette).

16. Répéter l'étape 16 pour saisir les noms de tous les échantillons supplémentaires (figure 4).

Remarque : pour modifier un nom d'échantillon, cliquer sur « Sample Name » dans la liste d'échantillons et l'échantillon sélectionné s'affichera dans le champ « Sample Name » au-dessus. Modifier le nom de l'échantillon selon la nomenclature locale et appuyer sur Entrée pour actualiser le nom.

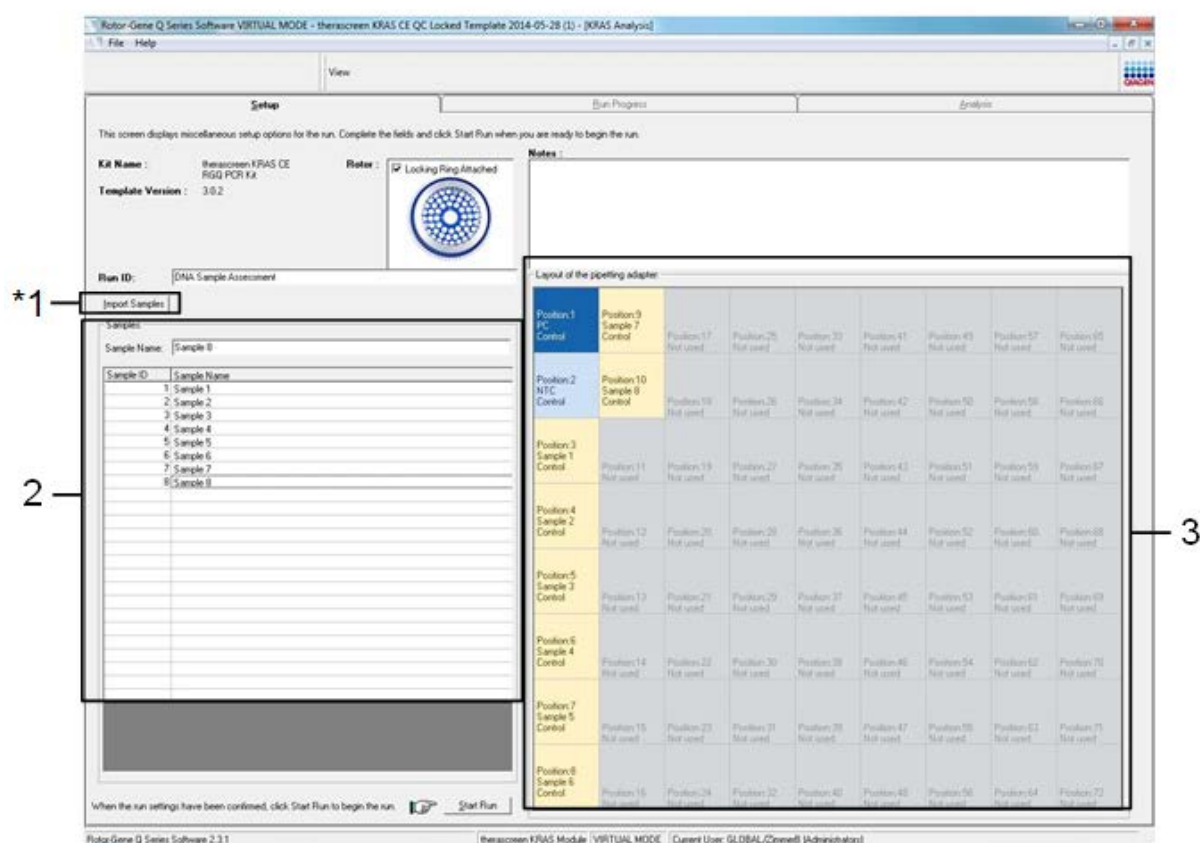


Figure 4. Saisie de nouveaux noms d'échantillons dans le champ « Sample Name » (nom d'échantillon). * 1 = bouton « Import Sample » (importer un échantillon), 2 = champ « Sample Name » (nom de l'échantillon) et liste d'échantillons, 3 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (agencement de l'adaptateur de pipette) avec nom d'échantillon supplémentaire.

17. Une fois tous les noms d'échantillons saisis, vérifier qu'ils sont corrects. Ajouter toute information complémentaire dans le champ « Notes » si nécessaire et cliquer sur « Start Run » (démarrer l'analyse) (figure 5).

Remarque : si une position de rotor est inutilisée, un avertissement (« Warning ») s'affiche (figures 5 et 6) pour rappeler à l'utilisateur que toutes les positions inutilisées du rotor doivent être occupées par un tube vide bouché. Vérifier que toutes les positions inutilisées du rotor sont occupées par un tube vide bouché et cliquer sur OK pour continuer.

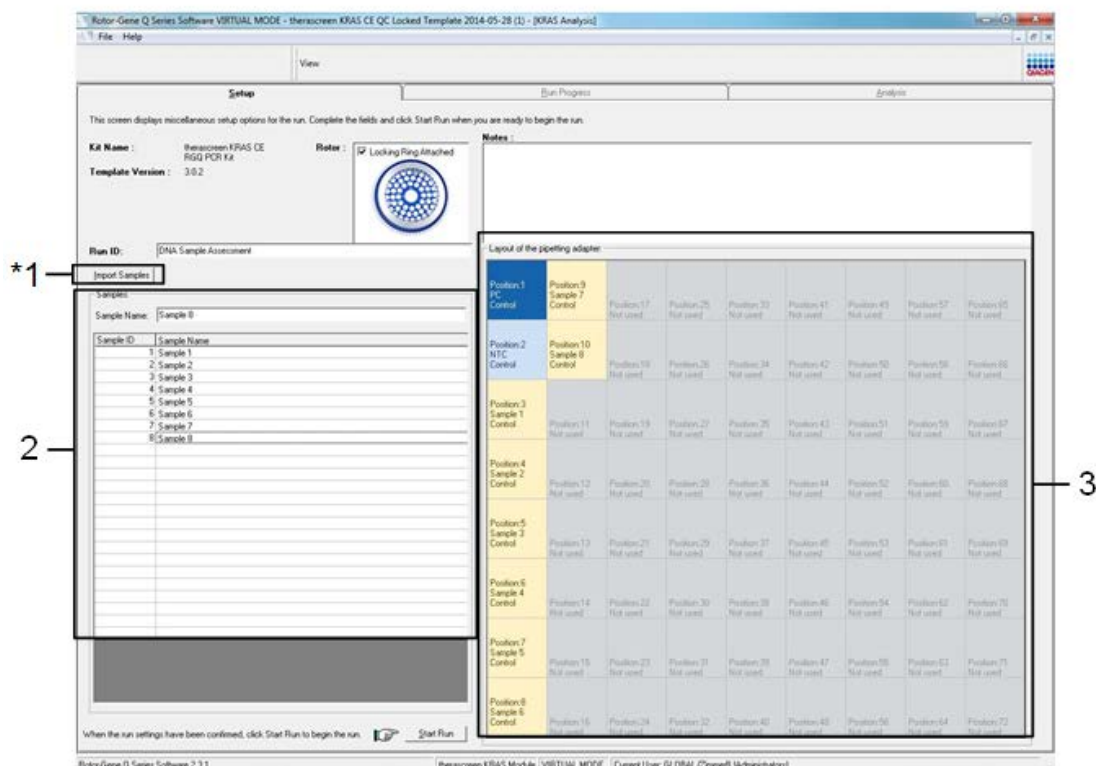


Figure 5. Champ « Notes », bouton « Start Run » (démarrer l'analyse) et avertissement concernant les positions de rotor inutilisées.

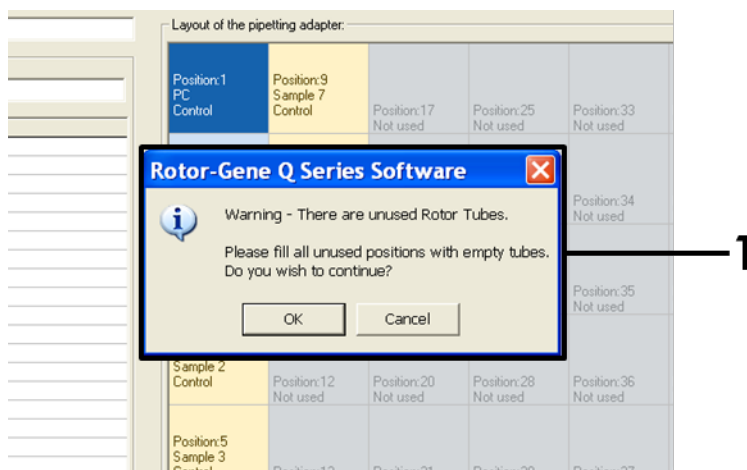


Figure 6. 1 = Avertissement concernant les positions de rotor inutilisées.

18. Une fenêtre « Save As » (enregistrer sous) s'affiche. Choisir un nom de fichier approprié et enregistrer l'analyse de PCR dans un fichier d'analyse *.rex à l'emplacement sélectionné. Cliquer sur « Save » (enregistrer) (figure 7).

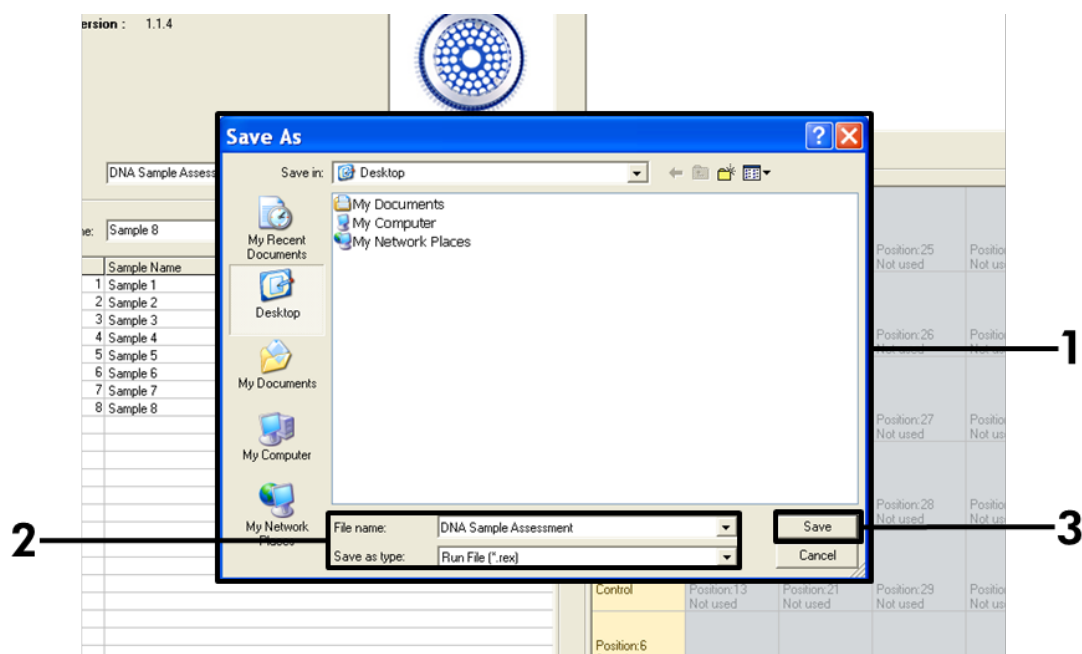


Figure 7. Enregistrement du fichier d'analyse. 1 = fenêtre « Save As » (enregistrer sous), 2 = champs « File name » (nom de fichier) et « Save as type. *.rex file » (enregistrer sous type : fichier *.rex), 3 = « Save » (enregistrer).

19. L'analyse PCR démarre.

Remarque : lorsque l'analyse démarre, l'onglet « Run Progress » (progression de l'analyse) s'ouvre automatiquement pour indiquer un suivi de la température et le temps restant de l'analyse (figure 8).

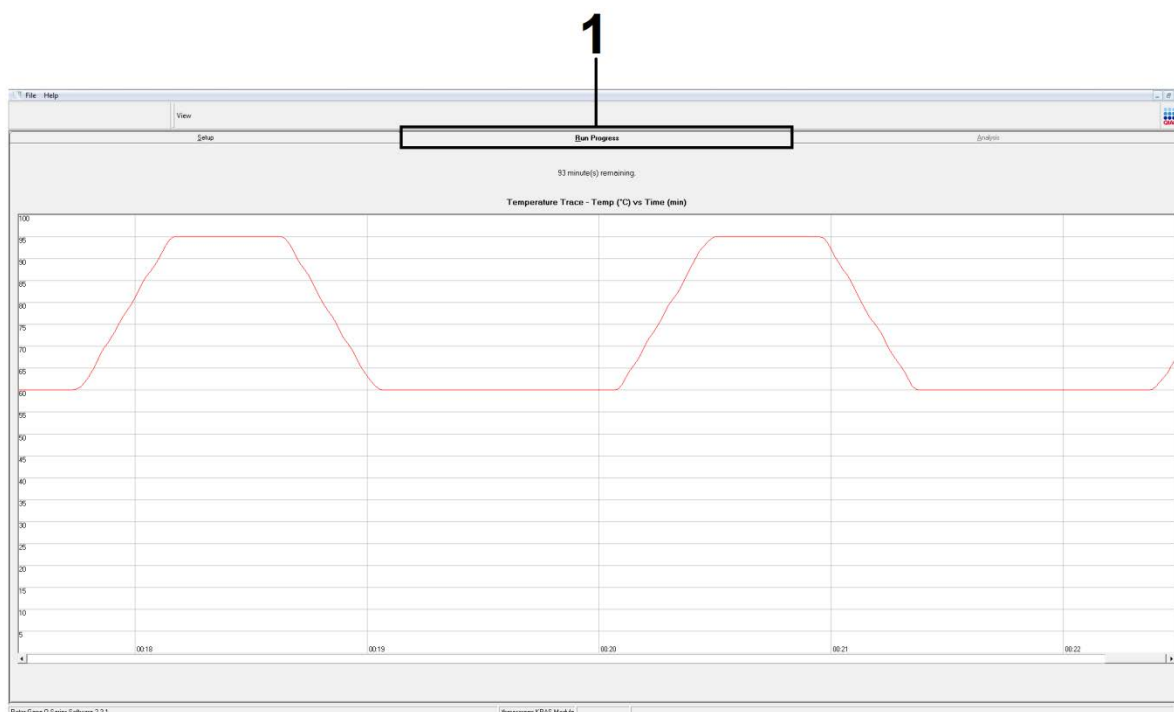


Figure 8. Onglet « Run Progress » (progression de l'analyse).

20. À la fin de l'analyse, l'onglet « Analysis » (analyse) s'ouvre automatiquement.

Remarque : si l'onglet « Analysis » (analyse) ne s'ouvre pas, cliquer dessus (figure 9).

Remarque : la méthode de calcul est expliquée à la section « Interprétation des résultats », page 39.

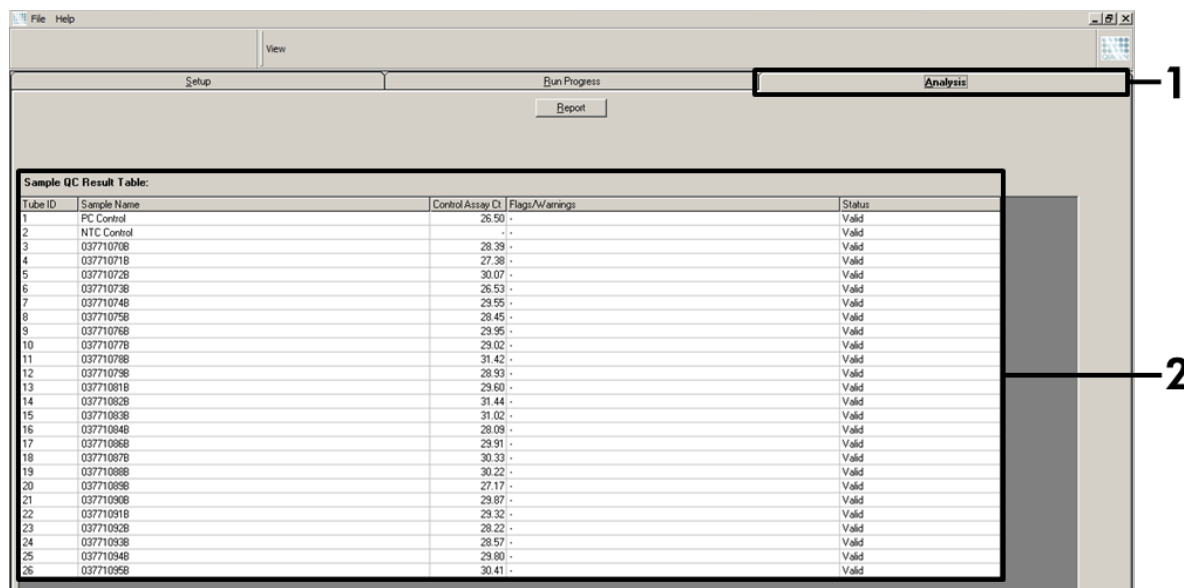


Figure 9. Onglet « Analysis » et rapport de résultats. 1 = onglet « Analysis », 2 = « Sample QC Result Table » (tableau des résultats de CQ d'échantillons).

21. Les résultats de contrôle sont rapportés comme suit dans le tableau « Sample QC Result Table » (point 2 sur la figure 9).

- **Contrôles d'analyse** (PC et NTC, positions respectives de tube 1 et 2) : la mention « Valid » s'affiche si les résultats se trouvent dans les intervalles acceptables. Dans le cas contraire, la mention « Invalid » s'affiche.
- **Valeur C_T de réaction de contrôle > 32,00** : la mention « Invalid » s'affiche. La quantité d'ADN n'est pas suffisante pour l'analyse de la mutation. Retester l'échantillon. Si la quantité d'ADN est toujours insuffisante, extraire davantage de tissu tumoral si possible (voir « Guide de dépannage », page 40).
- **Valeur C_T de réaction de contrôle < 21,92** : la mention « Invalid » s'affiche. La concentration d'ADN est trop élevée pour l'analyse de la mutation. Diluer avec de l'eau sans nucléase pour dilution (Dil.) et refaire le test. Diluer pour obtenir une valeur C_T comprise entre 21,92 et 32,00. Une dilution de 1:1 augmente la valeur C_T de 1,0 approximativement.

- **Valeur C_T de réaction de contrôle d'échantillon comprise entre 21,92 et 32,00** ($21,92 \leq C_T \text{ de contrôle} \leq 32,00$) : la mention « Valid » s'affiche. La concentration d'ADN est adaptée à l'analyse de la mutation.

Remarque : si une nouvelle extraction ou une dilution est nécessaire, répéter la réaction de contrôle pour confirmer que la concentration d'ADN est correcte.

- 22. Les fichiers de rapports sont accessibles via le bouton « Report ». La fenêtre « Report Browser » (navigateur de rapports) s'affiche alors. Sélectionner « KRAS Analysis Report » (rapport d'analyse KRAS) sous « Templates » (modèles) et cliquer sur « Show » (afficher) (figure 10).**

Remarque : il est possible d'enregistrer les rapports à un autre emplacement au format archive Web en cliquant sur le bouton « Save As » (enregistrer sous) dans le coin supérieur gauche de chaque rapport.

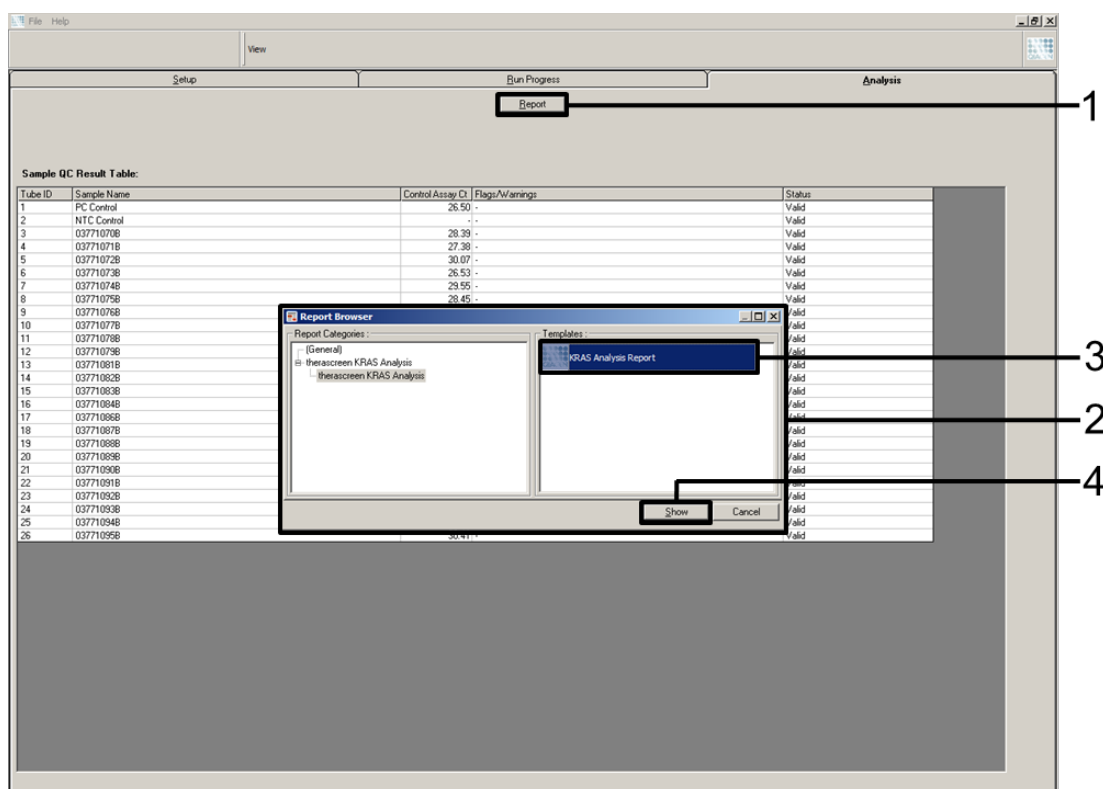


Figure 10. Sélection du « KRAS Analysis Report » (rapport d'analyse KRAS). 1 = « Report » (rapport), 2 = fenêtre « Report Browser » (navigateur de rapports), 3 = sélection « KRAS Analysis Report » (rapport d'analyse KRAS), 4 = « Show » (afficher).

Protocole : détection des mutations KRAS

Ce protocole est utilisé pour la détection des mutations KRAS.

Points importants avant de commencer

- Une fois l'évaluation de l'échantillon réussie, ce dernier peut être testé à l'aide des tests de mutation KRAS.
- Pour une utilisation efficace du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR, les échantillons doivent être regroupés en lots de 7 (afin de remplir le rotor de 72 puits). Avec des lots plus petits, moins d'échantillons pourront être testés avec le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR.
- Avant la première utilisation de l'instrument Rotor-Gene Q MDx, s'assurer que le logiciel *therascreen* KRAS Assay Package correct correspondant à la version du logiciel Rotor-Gene Q est installé (voir « Annexe 2 : Installation du logiciel *therascreen* KRAS Assay Package », page 98).

Procédure

1. **Mélanger les réactifs décongelés en retournant chaque tube 10 fois pour éviter toute concentration localisée de sels. Centrifuger brièvement pour pouvoir prélever le contenu au fond du tube.**
2. **Remplir une pipette à un volume inférieur au total du mélange réactionnel et bien mélanger les master mix en aspirant l'ensemble 10 fois vers le haut et vers le bas.**
3. **Ajouter immédiatement 20 µL de master mix dans chaque tube de PCR correspondant.**

Remarque : se reporter au tableau 5 pour la disposition des tubes lors de la configuration des mélanges réactionnels. Pour la détection des mutations KRAS, les master mix doivent être ajoutés à 8 tubes de PC, 8 tubes de NTC et 8 tubes pour chaque échantillon d'ADN.

Tableau 5. Agencement de l'analyse pour la détection des mutations KRAS dans le bloc de chargement

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

* Les chiffres indiquent les positions dans le bloc de chargement et la position finale dans le rotor.

4. Ajouter immédiatement 5 µl d'eau sans nucléase pour le contrôle négatif (NTC) aux tubes de NTC (positions de tube 9 à 16) et boucher les tubes.
5. Ajouter 5 µl de chaque échantillon d'ADN aux tubes d'échantillon (positions de tubes 17 à 72) et boucher les tubes.
6. Ajouter 5 µl de contrôle positif KRAS (PC) aux tubes de PC (positions de tube 1 à 8) et boucher les tubes.
7. À l'aide d'un marqueur permanent, identifier le couvercle des tubes se trouvant dans les positions numériques les plus faibles pour chaque barrette de 4 tubes de PCR (par ex. positions 1, 5 et 9, etc.) pour indiquer l'orientation de chargement des tubes dans le rotor à 72 puits de l'instrument Rotor-Gene Q MDx.
8. Retourner 4 fois les tubes bouchés pour mélanger l'échantillon et le mélange réactionnel.
9. Placer toutes les barrettes de 4 tubes de PCR dans les positions appropriées du rotor à 72 puits selon l'agencement de l'analyse (tableau 5) en s'aidant des marques pour une bonne orientation.

Remarque : chaque analyse PCR peut comprendre un maximum de 7 échantillons. Si le rotor n'est pas complètement rempli, placer dans toutes les positions non utilisées un tube vide bouché. Cela permet de maintenir l'efficacité thermique de l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

10. Placer le rotor de 72 puits dans l'instrument Rotor-Gene Q MDx. S'assurer que la bague de fermeture (fournie avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx) est placée au-dessus du rotor pour que les tubes ne bougent pas lors de l'analyse.
11. Lancer le logiciel Rotor-Gene Q et ouvrir la matrice simultanément en double-cliquant sur l'icône « **therascreen KRAS Locked Template** » située sur le bureau de l'ordinateur portable connecté à l'instrument Rotor-Gene Q MDx (figure 11).

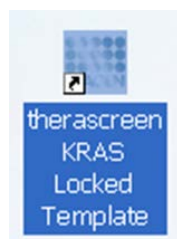


Figure 11. Icône « **therascreen KRAS Locked Template** ».

12. L'onglet « **Setup** » (configuration) s'affiche par défaut (figure 12). S'assurer que la bague de fermeture est correctement fixée et cocher la case « **Locking Ring Attached** » (bague de fermeture fixée). Fermer le couvercle de l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

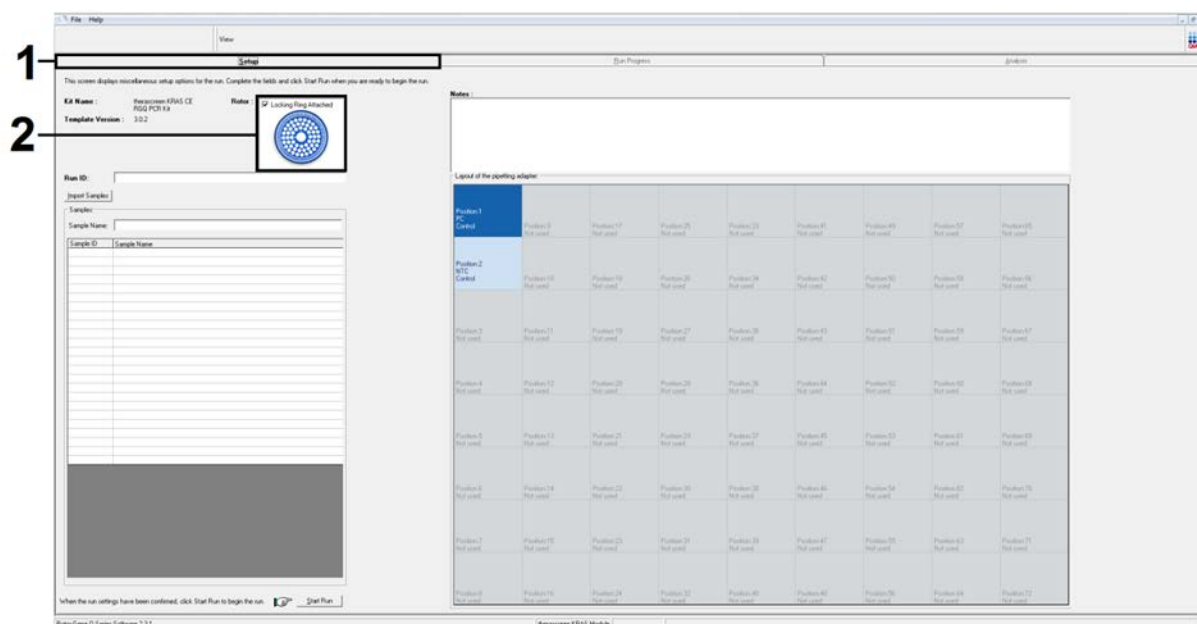


Figure 12. 1 = onglet « **Setup** » (configuration) et 2 = case « **Locking Ring Attached** » (bague de fermeture fixée).

13. Entrer l'identifiant de l'analyse dans le champ « **Run ID** » (identifiant d'analyse) selon la nomenclature locale.
14. Entrer le nom de l'échantillon dans le champ « **Sample Name** » (nom d'échantillon) selon la nomenclature locale et appuyer sur Entrée.

Le nom de l'échantillon est alors ajouté à la liste d'échantillons au-dessous et l'échantillon se voit attribuer un « Sample ID » (ID échantillon) : 1, 2, 3, etc. En outre, le panneau « Layout of the pipetting adapter » (agencement de l'adaptateur de pipette) sur la droite est mis à jour pour afficher le nom de l'échantillon (figure 13).

Remarque : dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (agencement de l'adaptateur de pipette), vérifier que l'ajout du nom de l'échantillon est mis en évidence par un changement de couleur et que les 8 tests de la colonne située sous le cercle de l'échantillon sont en surbrillance (figure 13).

Remarque : il est possible d'ajouter jusqu'à 7 échantillons. Les identifiants d'échantillons (dans les cercles d'échantillons) sont automatiquement attribués de 1 à 7.

Remarque : les noms d'échantillons comportant plus de 8 caractères ne s'affichent pas entièrement dans le panneau « Layout of the pipetting adapter ».

Il est également possible d'importer les noms d'échantillons enregistrés au format *.smp (fichier échantillon Rotor-Gene Q) ou *.csv (comma-separated values, valeurs séparées par des virgules) avec le bouton « Import Samples » (importer des échantillons). Les noms d'échantillons seront automatiquement renseignés avec cette méthode.

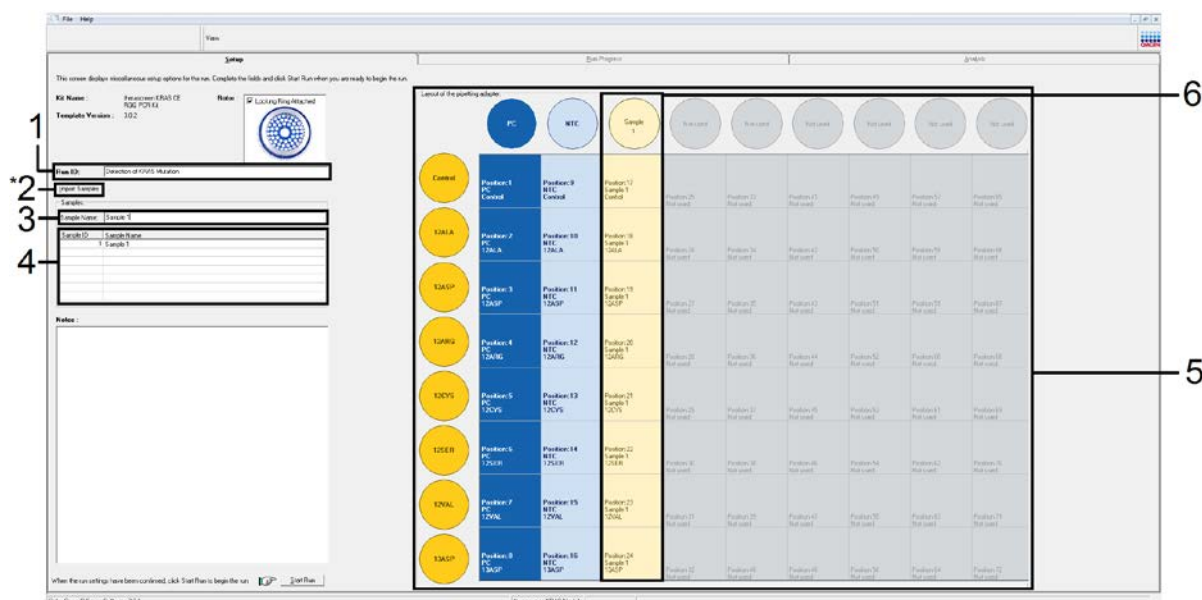


Figure 13. Saisie de l'identifiant d'analyse et du nom d'échantillon. 1 = champ « Run ID » (identifiant d'analyse), 2 = bouton « Import sample » (importer un échantillon ; non disponible dans la version 2.1 du logiciel), 3 = champ « Sample Name » (nom de l'échantillon), 4 = liste d'échantillons, 5 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (agencement de l'adaptateur de pipette), 6 = cercle de l'échantillon en surbrillance au-dessus d'une colonne de 8 analyses.

15. Répéter l'étape 14 pour saisir les noms de tous les échantillons supplémentaires (figure 14).

Remarque : pour modifier un nom d'échantillon, cliquer sur « Sample Name » dans la liste d'échantillons et l'échantillon sélectionné s'affichera dans le champ « Sample Name » au-dessus. Modifier le nom de l'échantillon selon la nomenclature locale et appuyer sur Entrée pour actualiser le nom.

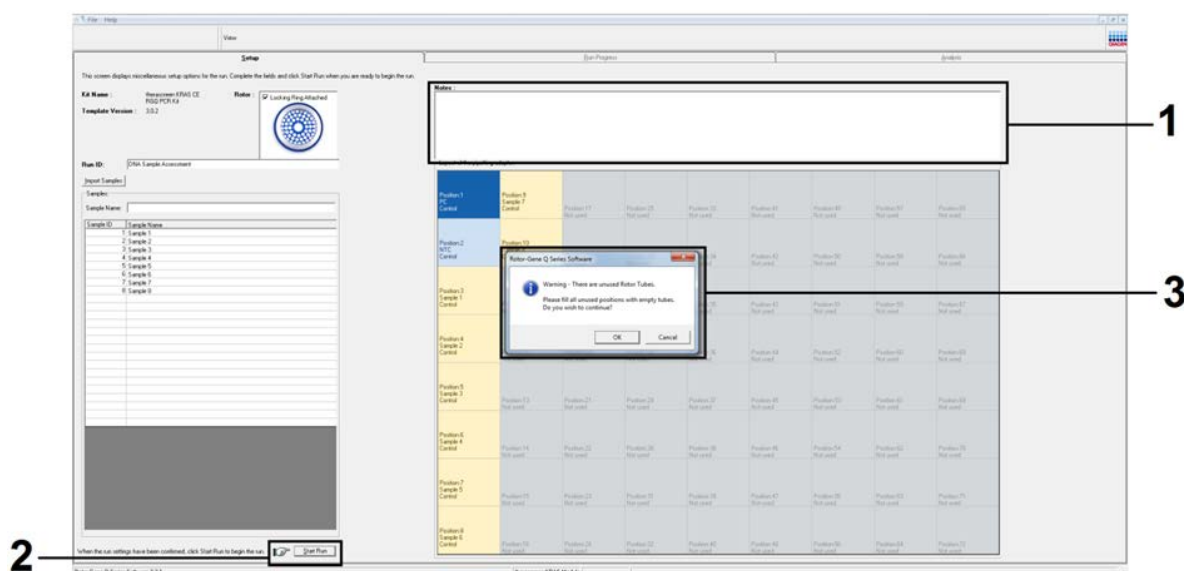


Figure 14. Saisie de nouveaux noms d'échantillons dans le champ « Sample Name » (nom d'échantillon). 1 = champ « Sample Name » (nom de l'échantillon), 2 = liste d'échantillons, 3 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (agencement de l'adaptateur de pipette) avec noms d'échantillons supplémentaires.

16. Une fois tous les noms d'échantillons saisis, vérifier qu'ils sont corrects. Ajouter toute information complémentaire dans le champ « Notes » si nécessaire et cliquer sur le bouton « Start Run » (démarrer l'analyse) (figure 15).

Remarque : si une position de rotor est inutilisée, un avertissement (« Warning ») s'affiche (figures 15 et 16) pour rappeler à l'utilisateur que toutes les positions inutilisées du rotor doivent être occupées par un tube vide bouché. Vérifier que toutes les positions inutilisées du rotor sont occupées par un tube vide bouché et cliquer sur OK pour continuer.

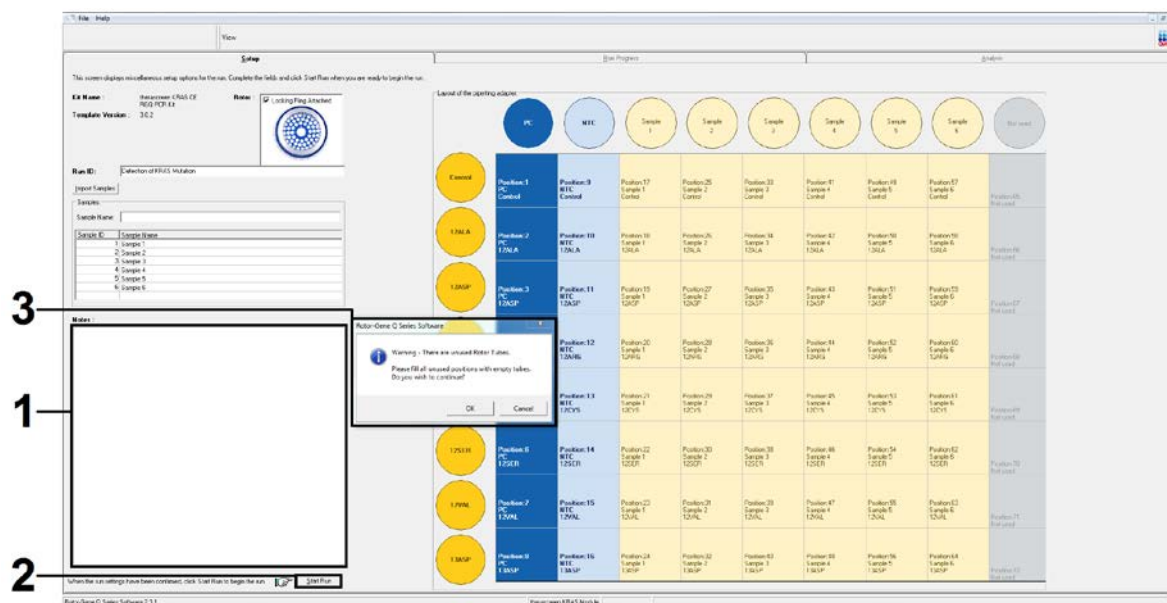


Figure 15. 1 = champ « Notes », 2 = « Start Run » (démarrer l'analyse), 3 = avertissement concernant les positions de rotor inutilisées.

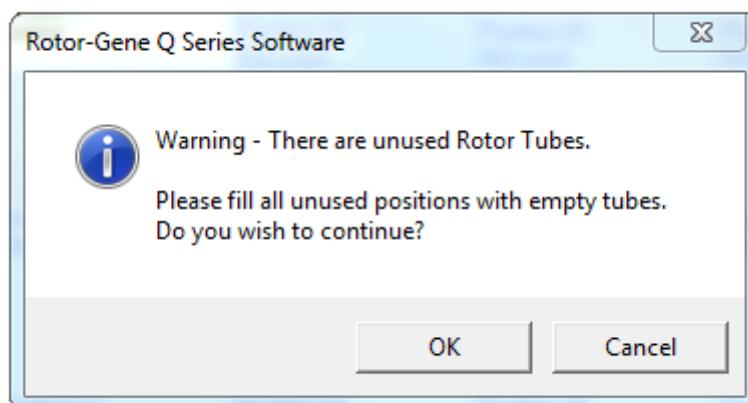


Figure 16. Avertissement concernant les positions de rotor inutilisées.

17. Une fenêtre « Save As » (enregistrer sous) s'affiche. Choisir un nom de fichier approprié et enregistrer l'analyse de PCR dans un fichier d'analyse *.rex à l'emplacement sélectionné (figure 17).

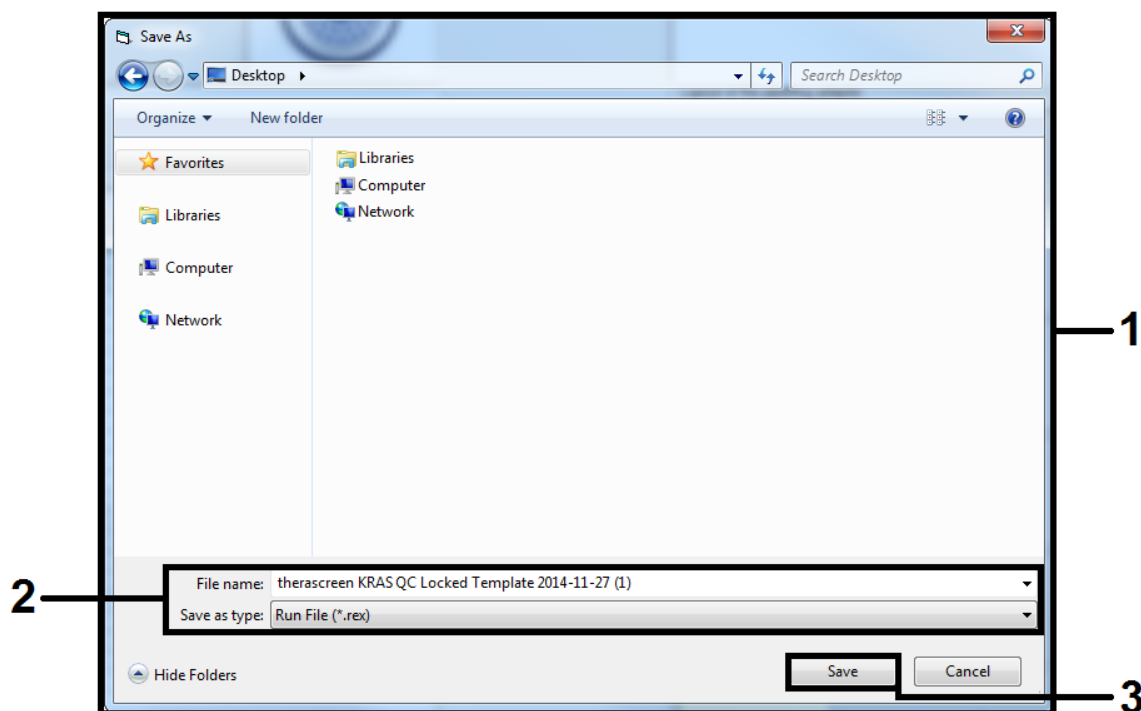


Figure 17. Enregistrement du fichier d'analyse.

18. L'analyse PCR démarre.

Remarque : lorsque l'analyse démarre, l'onglet « Run Progress » (progression de l'analyse) s'ouvre automatiquement pour indiquer un suivi de la température et le temps restant de l'analyse (figure 18).

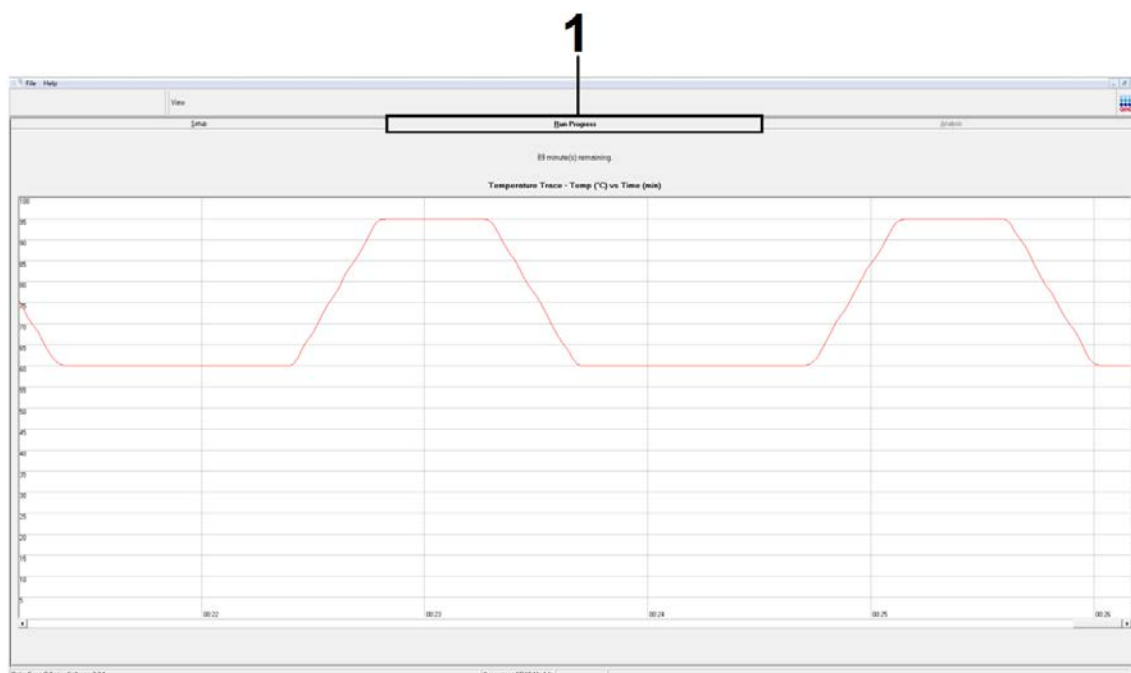


Figure 18. 1 = onglet « Run Progress » (progression de l'analyse).

19. À la fin de l'analyse, l'onglet « Analysis » (analyse) s'ouvre automatiquement.

Remarque : si l'onglet « Analysis » (analyse) ne s'ouvre pas, cliquer dessus (figure 19).

Remarque : la méthode de calcul est expliquée à la section « Interprétation des résultats », page 39.

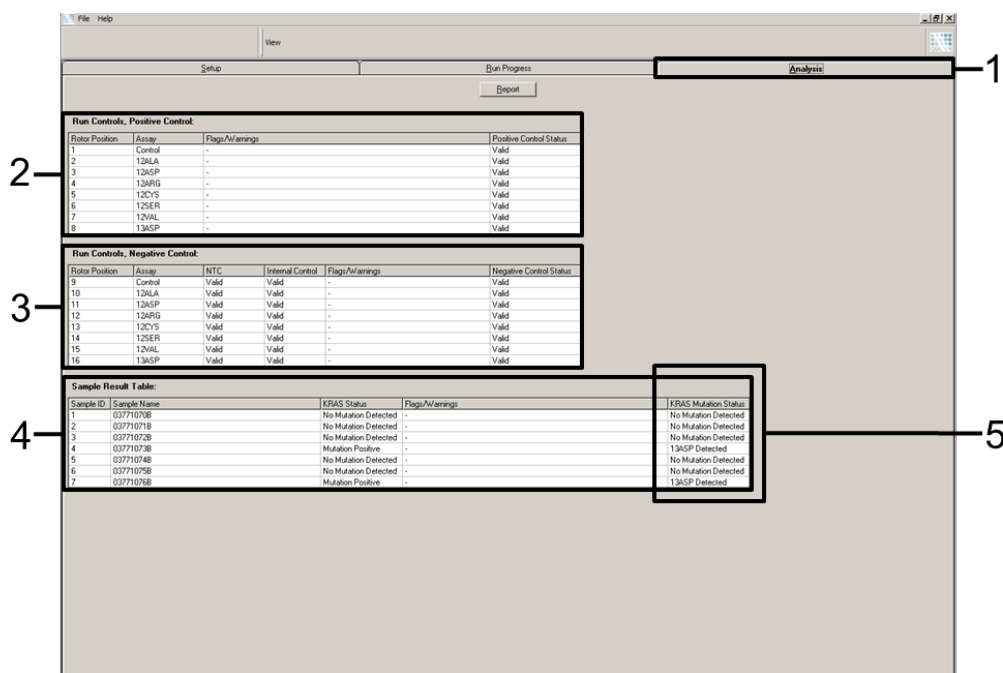


Figure 19. Onglet « Analysis » et rapport de résultats. 1 = onglet « Analysis » (analyse), 2 = panneau « Run Controls, Positive Control » (témoins d'analyse, témoin positif), 3 = panneau « Run Controls, Negative Control » (témoins d'analyse, témoin négatif), 4 = tableau « Sample Result Table » (résultats d'échantillons), 5 = colonne « KRAS Mutation Status » (état mutationnel du gène KRAS).

20. Les résultats de tests sont rapportés comme suit (figure 19) :

- **Panneau « Run Controls, Positive Control » (contrôles d'analyse, contrôle positif) :** si les résultats se trouvent dans un intervalle acceptable, la colonne « Positive Control Status » (état du contrôle positif) indique « Valid ». Dans le cas contraire, la mention « Invalid » s'affiche.
- **Panneau « Run Controls, Negative Control » (contrôles d'analyse, contrôle négatif) :** si les résultats du NTC et du contrôle interne se trouvent dans un intervalle acceptable, la colonne « Negative Control Status » (état du contrôle négatif) indique « Valid ». Dans le cas contraire, la mention « Invalid » s'affiche.
- **Panneau « Sample Result Table » (tableau de résultats d'échantillons) :** les mutations spécifiques sont rapportées pour les échantillons présentant une mutation positive dans la colonne « KRAS Mutation Status » (état mutationnel du gène KRAS).

21. Les fichiers de rapports sont accessibles via le bouton « Report ». La fenêtre « Report Browser » (navigateur de rapports) s'affiche alors. Sélectionner « KRAS Analysis Report » (rapport d'analyse KRAS) sous « Templates » (modèles) et cliquer sur « Show » (afficher) (figure 20).

Remarque : il est possible d'enregistrer les rapports à un autre emplacement au format archive Web en cliquant sur « Save As » (enregistrer sous) dans le coin supérieur gauche de chaque rapport.

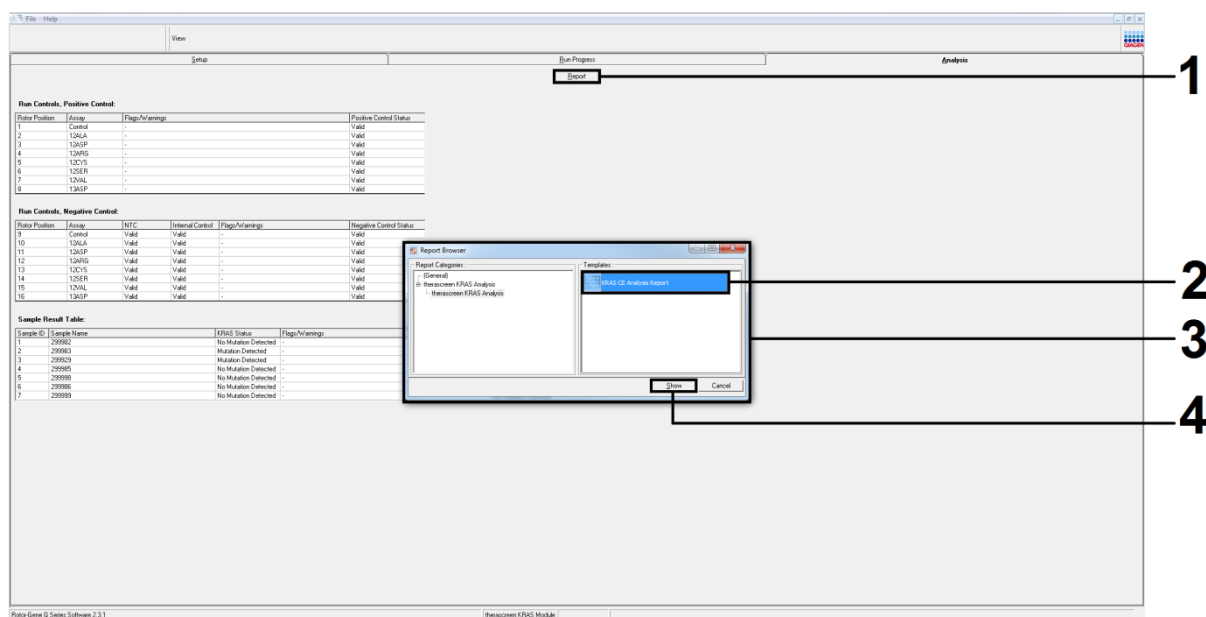


Figure 20. Sélection du « KRAS Analysis Report » (rapport d'analyse KRAS). 1 = « Report » (rapport), 2 = fenêtre « Report Browser » (navigateur de rapports), 3 = sélection « KRAS Analysis Report » (rapport d'analyse KRAS), 4 = « Show » (afficher).

Interprétation des résultats

L'analyse et les détections de mutations sont effectuées automatiquement par le logiciel *therascreen* KRAS Assay Package une fois que l'analyse est terminée. La section suivante fournit des explications sur l'analyse et la détection de mutations par le logiciel *therascreen* KRAS Assay Package.

Remarque : pour l'analyse manuelle, voir « Annexe 1 : Protocole manuel du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR », page 76.

Le cycle de PCR auquel la fluorescence d'une réaction en particulier atteint une valeur seuil est défini comme la valeur C_T . Les valeurs C_T indiquent la quantité d'ADN d'entrée spécifique. Des valeurs C_T faibles indiquent des niveaux d'ADN d'entrée élevés, tandis que des valeurs C_T élevées indiquent des niveaux d'ADN d'entrée faibles. Les réactions comportant une valeur C_T sont classées comme amplification positive.

Le logiciel Rotor-Gene Q interpole les signaux de fluorescence entre deux valeurs enregistrées. Les valeurs C_T peuvent alors être tout nombre réel (entier ou non) compris dans un intervalle de 0 à 40.

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

La valeur ΔC_T est déterminée à l'aide de l'équation suivante :

$$\Delta C_T = [\text{valeur } C_T \text{ test de mutation}] - [\text{valeur } C_T \text{ test de contrôle}]$$

Les contrôles d'analyse (contrôle positif, NTC et contrôles internes) sont évalués pour assurer que les valeurs C_T sont acceptables et que les réactions sont correctes.

Les valeurs ΔC_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 de contrôle du même échantillon. On estime que les échantillons présentent une mutation positive si leur ΔC_T est inférieur ou égal à la valeur ΔC_T seuil de ce test. Au-dessus de cette valeur, l'échantillon peut soit contenir moins que le pourcentage de mutation détectable par le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR (au-delà de la limite des tests), soit présenter une mutation négative, rapportée comme « No Mutation Detected » (aucune mutation détectée).

L'absence d'amplification dans les réactions de mutation est rapportée en tant que « No Mutation Detected » (aucune mutation détectée). Les valeurs ΔC_T calculées à partir de l'amplification du bruit de fond sont censés être supérieures

aux valeurs ΔC_T seuil et l'échantillon est classé comme « No Mutation Detected » (aucune mutation détectée).

Les résultats de tests s'affichent comme suit : « Mutation Positive », « No Mutation Detected », « Invalid » ou, en cas d'échec d'un contrôle d'analyse, « Run Control Failed ». Pour les échantillons présentant une mutation positive, les mutations spécifiques sont rapportées.

Les autres résultats possibles pouvant être affichés sont décrits dans la section « Protocole : évaluation des échantillons d'ADN », page 16 de ce manuel.

Dans de rares cas, une tumeur peut contenir plusieurs mutations. C'est alors la mutation correspondant à la valeur ΔC_T la plus faible qui est identifiée.

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. Les techniciens 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).

Commentaires et suggestions

Résultats invalides

- | | |
|--|---|
| a) Les conditions de conservation pour au moins un kit de composants ne respectaient pas les instructions données dans « Stockage et manipulation des réactifs » (page 13) | Vérifier les conditions de conservation et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit si nécessaire. |
| b) Le kit <i>therascreen</i> KRAS 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. |

Les échantillons NTC indiquent des résultats positifs dans le canal FAM

La contamination s'est produite lors de la préparation de la PCR	<p>Répéter la PCR avec de nouveaux réactifs.</p> <p>Si possible, fermer les tubes de PCR directement après y avoir ajouté les échantillons à tester.</p> <p>S'assurer que l'espace de travail et les instruments sont décontaminés régulièrement.</p>
--	---

Avertissements générés par le logiciel *therascreen* KRAS Assay Package

Le tableau 6 répertorie les messages pouvant être générés par le logiciel *therascreen* KRAS Assay Package, leur signification et les actions à entreprendre.

Tableau 6. Messages du logiciel *therascreen* KRAS Assay Package

Message	Signification	Action à entreprendre
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Analyse PCR invalide, C _T FAM hors intervalle pour le contrôle positif lors de la réaction de contrôle.	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Analyse PCR invalide, C _T FAM hors intervalle pour au moins une réaction du contrôle de mutation.	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Analyse PCR invalide, impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle positif (mélange réactionnel de contrôle).	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.

Message	Signification	Action à entreprendre
PC_MUTATION _INVALID_DATA	Analyse PCR invalide, impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle positif (mélange réactionnel de mutation).	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
NTC_INT_CTRL _FAIL	Analyse PCR invalide, contrôle interne au-dessus de l'intervalle pour le contrôle négatif.	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
NTC_INT_CTRL _EARLY_CT	Analyse PCR invalide, contrôle interne au-dessous de l'intervalle pour le contrôle négatif.	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
NTC_INVALID _CT	Analyse PCR invalide, FAM invalide (inférieur à la limite) pour le contrôle négatif.	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
NTC_INVALID _DATA	Analyse PCR invalide, impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle négatif.	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
SAMPLE_CTRL _INVALID_DATA	Échantillon invalide, impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle d'échantillon.	Configurer une nouvelle analyse PCR pour répéter le ou les échantillons concernés.

Message	Signification	Action à entreprendre
SAMPLE_CTRL _HIGH_CONC	Échantillon invalide, C _T FAM trop faible dans le contrôle d'échantillon.	Diluer l'échantillon pour augmenter la valeur C _T du contrôle. Cette dilution doit être calculée d'après l'hypothèse selon laquelle une dilution de 1:1 dans l'eau fournie avec le kit augmente le C _T de 1,0. Une fois l'échantillon dilué, configurer une nouvelle analyse PCR pour répéter l'échantillon.
SAMPLE_CTRL _FAIL	Échantillon invalide, C _T FAM trop élevé dans la réaction du contrôle d'échantillon.	Configurer une nouvelle analyse PCR pour répéter l'échantillon. Si celui-ci demeure invalide lors de la nouvelle analyse PCR, extraire l'échantillon d'un ou de plusieurs nouveaux tissus FFPE. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est toujours invalide, retester cette seconde extraction. Si le résultat n'est toujours pas valide après cette analyse, l'état mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué.

Message	Signification	Action à entreprendre
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T trop élevé (ou aucun C _T) pour le contrôle interne (HEX), canal FAM présentant une mutation négative.	<p>Si l'échantillon est désigné comme valide : aucune action.</p> <p>Échantillons de CRC : Si l'échantillon est désigné comme invalide, configurer une nouvelle analyse PCR pour répéter l'échantillon. Si celui-ci demeure invalide lors de la nouvelle analyse PCR, extraire l'échantillon d'un ou de plusieurs nouveaux tissus FFPE. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est toujours invalide, retester cette seconde extraction. Si le résultat n'est toujours pas valide après cette analyse, l'état mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué.</p>

Message	Signification	Action à entreprendre
SAMPLE_INT _CTRL_FAIL (suite)		<p>Échantillons de CPNPC :</p> <p>si l'échantillon est désigné comme invalide, diluer l'échantillon restant à 1:8 dans de l'eau du tube marqué DIL afin de garantir que le volume final soit supérieur à 40 µl (par ex. 10 µl d'ADN et 70 µl d'eau du tube marqué DIL) et configurer une nouvelle analyse PCR pour répéter l'échantillon. Si celui-ci demeure invalide lors de la nouvelle analyse PCR, extraire l'échantillon d'un ou de plusieurs nouveaux tissus FFPE. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si l'échantillon est invalide, diluer l'échantillon restant à 1:8 dans de l'eau du tube marqué DIL afin de garantir que le volume final soit supérieur à 40 µl, et tester cette dilution. Si le résultat n'est toujours pas valide après cette analyse, l'état mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué.</p>

Message	Signification	Action à entreprendre
SAMPLE_INT _CTRL_EARLY _CT	Tube de mutation invalide, C _T HEX trop faible pour l'échantillon (contrôle interne).	<p>Si l'échantillon est désigné comme valide : aucune action.</p> <p>Si l'échantillon est désigné comme invalide, configurer une nouvelle analyse PCR pour répéter l'échantillon.</p> <p>Si celui-ci demeure invalide lors de la nouvelle analyse PCR, extraire l'échantillon d'un ou de plusieurs nouveaux tissus FFPE. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est toujours invalide, retester cette seconde extraction. Si le résultat n'est toujours pas valide après cette analyse, l'état mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué.</p>

Message	Signification	Action à entreprendre
SAMPLE _INVALID _DATA	Tube de mutation invalide, impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle interne.	<p>Si l'échantillon est désigné comme valide : aucune action.</p> <p>Si l'échantillon est désigné comme invalide, configurer une nouvelle analyse PCR pour répéter l'échantillon. Si celui-ci demeure invalide lors de la nouvelle analyse PCR, extraire l'échantillon d'un ou de plusieurs nouveaux tissus FFPE. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est toujours invalide, retester cette seconde extraction. Si le résultat n'est toujours pas valide après cette analyse, l'état mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué.</p>

Message	Signification	Action à entreprendre
MUTATION _EARLY_CT	Tube de mutation invalide, C _T FAM trop faible pour l'échantillon.	<p>Si l'échantillon est désigné comme valide : aucune action.</p> <p>Si l'échantillon est désigné comme invalide, configurer une nouvelle analyse PCR pour répéter l'échantillon. Si celui-ci demeure invalide lors de la nouvelle analyse PCR, extraire l'échantillon d'un ou de plusieurs nouveaux tissus FFPE. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est toujours invalide, retester cette seconde extraction. Si le résultat n'est toujours pas valide après cette analyse, l'état mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué.</p>
SAMPLE_POSITIVE _AND_INVALID	Au moins une mutation d'un échantillon est valide et positive, et au moins une mutation du même échantillon est invalide (avertissement et non erreur).	Aucune.

Contrôle qualité

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

Limitations

Le test est conçu pour détecter 7 mutations dans les codons 12 et 13 du gène KRAS. Les échantillons dont les résultats sont rapportés comme « No Mutation Detected » (aucune mutation détectée) peuvent présenter des mutations KRAS non détectées par le test (par ex. 13CYS).

La détection des mutations dépend de l'intégrité des échantillons et de la quantité d'ADN amplifiable présent dans le prélèvement. Il est recommandé de répéter la procédure au cas où l'évaluation initiale de l'ADN de l'échantillon indique que la quantité est trop faible ou trop élevée pour l'analyse de la mutation.

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR est utilisé dans le cadre d'une procédure de réaction en chaîne par polymérase (PCR). Comme pour toutes les procédures de PCR, les échantillons peuvent être contaminés par des sources externes d'ADN dans l'environnement du test et par l'ADN du contrôle positif. Faire preuve de prudence afin d'éviter la contamination des échantillons et des réactifs du mélange réactionnel.

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR est uniquement destiné à distinguer l'ADN mutant de l'ADN de type sauvage. Le test a été conçu de façon que chacune des réactions mutantes soit le plus sensible à la mutation spécifique mesurée. Toutefois, pour les échantillons pour lesquels une mutation est détectée, une réactivité croisée peut être observée avec d'autres réactions de mutation. Si plusieurs réactions mutantes sont positives, le résultat est celui dont le résultat de ΔC_T est le plus faible.

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR n'est validé que pour les tissus FFPE de CRC et CPNPC.

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR a été validé pour l'utilisation avec le kit QIAamp DNA FFPE Tissue. Seul l'instrument Rotor-Gene Q MDx a été validé pour une utilisation avec le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR.

Caractéristiques des performances

Performances analytiques

Les caractéristiques de performances spécifiques du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR ont été déterminées par des études impliquant des échantillons de tissu FFPE prélevés sur des patients atteints de CRC et des patients atteints de CPNPC. Les méthodes d'acquisition pour les échantillons de CPNPC comprenaient la biopsie au trocart (BAT), l'aspiration à l'aiguille fine (BAAF) et la résection. Pour chaque type d'échantillon, 8 lignées cellulaires humaines FFPE, dont 7 présentent des mutations KRAS connues détectées par le test, et un gène KRAS de type sauvage (aucune mutation au niveau des codons 12 et 13) ont été utilisées. L'état mutationnel des échantillons a été confirmé par un séquençage bidirectionnel Sanger.

Seuil

À l'aide d'une méthode conforme aux directives du CLSI EP17-A (2004) (8), 225 échantillons FFPE ont été testés afin d'établir les seuils du test. L'intervalle C_T de la réaction de contrôle a été établi entre 21,92 et 32,00. Les valeurs seuil, fondées sur le C_T de la réaction de contrôle soustrait du C_T des réactions mutantes (ΔC_T), sont indiquées dans le tableau 7.

Tableau 7. Valeurs seuil établies pour chaque test de mutation

	Test de mutation						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Seuil ($\leq \Delta C_T$)	8,0	6,6	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5

Limite du blanc

Afin d'évaluer les performances du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR en l'absence de matrice positive mutante et d'assurer qu'un blanc d'échantillon ne génère pas de signal analytique pouvant indiquer une faible concentration de mutation, les échantillons négatifs ont été évalués. Les résultats n'ont révélé aucune valeur C_T de contrôle ou mutante détectable dans les tubes réactionnels de contrôle ou de mutation (les valeurs C_T des contrôles internes étaient toutes valides).

Comparaison avec la méthode de référence analytique : CRC

Deux études ont été menées pour démontrer la concordance dans l'état mutationnel des échantillons CRC testés avec le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR par rapport au séquençage bidirectionnel. Au total, 137 échantillons de FFPE ont présenté des résultats valides à la fois pour le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR et le séquençage bidirectionnel.

Les résultats globaux, exceptés 6 échantillons dont le séquençage bidirectionnel Sanger a échoué, sont indiqués dans le tableau 8. Le tableau 9 montre l'analyse de la concordance entre le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR et le séquençage bidirectionnel.

Tableau 8. Comparaison entre le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR et le séquençage bidirectionnel Sanger

Détections du kit <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR	Détection de mutations par séquençage bidirectionnel								Total
	Nég.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	
	Négatif	80	–	–	1	–	–	–	1
	Positive pour 12ALA	–	3	–	–	–	–	–	–
	Positive pour 12ARG	–	–	–	1	–	–	–	–
	Positive pour 12ASP	–	–	–	20	–	–	–	–
	Positive pour 12CYS	–	–	–	–	3	–	–	–
	Positive pour 12SER	–	–	–	–	–	–	–	–
	Positive pour 12VAL	2	–	–	–	–	–	14	–
	Positive pour 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	11
Total	83	3	0	22	3	0	14	12	137

Tableau 9. Analyse de la concordance

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

Un second ensemble unique d'échantillons a été évalué pour compléter les données de la première étude. Un ensemble de 271 échantillons FFPE de CRC a été fourni, dont 250 présentant un état mutationnel inconnu et 21 présentant un état mutationnel connu afin d'enrichir les mutations rares. Tous ont été comparés au séquençage bidirectionnel Sanger décrit précédemment.

L'analyse de la concordance a été effectuée sur 247 échantillons présentant des résultats valides à la fois selon le séquençage bidirectionnel et le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR. 9 échantillons étaient discordants. La concordance générale était de 96,4 %. Les données indiquent la concordance précise du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR (tableaux 10 et 11).

Tableau 10. Comparaison entre le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR et le séquençage bidirectionnel Sanger (deuxième étude)

		Détection de mutations par séquençage bidirectionnel							Total
		Nég.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	
Détecté par le kit <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR	Négatif	132	–	–	–	–	1	–	133
	Positive pour 12ALA	–	10	–	–	–	–	–	10
	Positive pour 12ARG	5	–	5	–	–	–	–	10
	Positive pour 12ASP	–	–	–	31	–	–	–	31
	Positive pour 12CYS	1	–	–	–	11	–	–	12
	Positive pour 12SER	–	–	–	–	–	13	–	13
	Positive pour 12VAL	2	–	–	–	–	–	25	27
	Positive pour 13ASP	–	–	–	–	–	–	–	11
Total		140	10	5	31	11	14	25	247

Tableau 11. Analyse de la concordance (deuxième étude)

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

Comparaison avec la méthode de référence analytique : CPNPC

Pour démontrer la concordance entre l'état mutationnel des échantillons de CPNPC testés avec le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR et celui de ces échantillons avec le séquençage bidirectionnel Sanger, les échantillons cliniques FFPE de CPNPC ont été acquis par résection, BAT et BAAF. L'ADN a été extrait de chaque échantillon avant le test à l'aide du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR. Les résultats de ce test ont été comparés à ceux obtenus à l'aide du séquençage bidirectionnel Sanger.

Au total, 360 échantillons ont présenté un résultat valide à la fois pour le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR et pour le séquençage bidirectionnel Sanger, avec 340 échantillons présentant des résultats concordants.

La concordance entre le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR et le séquençage bidirectionnel est indiquée au tableau 12. Deux échantillons ont donné lieu à une détection de double mutation par le séquençage bidirectionnel Sanger. Étant donné qu'une mutation était la même que le résultat du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR, ces échantillons ont été classés comme étant concordants pour l'analyse de la concordance globale, de la concordance positive et de la concordance négative (Tableau 13).

Tableau 12. Comparaison entre le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR et le séquençage bidirectionnel Sanger

Détection de mutations par séquençage bidirectionnel	Détectons du kit <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR									
	Nég.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Total	
	Négatif	261	1	–	4	6	2	5	1	280
	Positive pour 12ALA	–	4	–	–	–	–	–	–	4
	Positive pour 12ALA_12CYS	–	1	–	–	–	–	–	–	1
	Positive pour 12ARG	–	–	3	–	–	–	–	–	3
	Positive pour 12ASP	–	–	–	14	–	–	–	–	14
	Positive pour 12CYS	–	–	–	–	35	–	–	–	35
	Positive pour 12SER	–	–	–	–	–	–	1	–	1
	Positive pour 12VAL	2	–	–	–	–	–	17	–	17
Positive pour 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	4	5	
Total	262	6	3	18	41	2	23	5	360	

Tableau 13. Analyse de la concordance

Mesure de la concordance	Fréquence (%)	Intervalle de confiance (IC) de 95 %
Concordance globale en pourcentage	340/360 (94,44)	92,03-96,29
Concordance positive en pourcentage	79/80 (98,75)	94,21-99,94
Concordance négative en pourcentage	261/280 (93,21)	90,20-95,51

Limite de détection (LoD)

La plage de fonctionnement du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR est fondée sur la quantité d'ADN amplifiable dans le prélèvement telle qu'elle est déterminée par la valeur C_T de la réaction de contrôle. L'intervalle d'entrée indiqué pour le test est défini par l'intervalle préspecifié du C_T de contrôle de 21,92 à 32,00. La LoD est le pourcentage minimum d'ADN mutant pouvant être détecté dans un bruit de fond d'ADN de type sauvage lorsque l'ADN amplifiable total se situe dans l'intervalle d'entrée indiqué et au-dessous de la valeur ΔC_T seuil.

CRC

Une étude a été menée pour déterminer la LoD de chacune des 7 réactions spécifiques à la mutation intégrées dans le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR. Pour le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR, la limite de détection d'ADN mutant dans un bruit de fond d'ADN de type sauvage est définie comme le plus faible facteur de dilution auquel 95 % des réplicats de test pour chacun des échantillons positifs à la mutation ont été déterminés comme positifs.

Des modèles de régression logistique ont été appliqués à chaque test individuellement pour les ensembles de données d'ADN d'entrée faible et élevé. Dans ces modèles, la variable d'intérêt était binaire, avec pour résultats possibles la détection de la mutation (détection = 1) ou l'absence de détection (détection = 0). La variable explicative continue était de \log_2 % de dilution de la mutation. Les LoD ont été calculées comme le pourcentage de dilution de la mutation donnant une probabilité prédictive de détection de 0,95 (tableau 14).

Tableau 14. Valeurs LoD pour chaque test de mutation utilisant des lignées cellulaires FFPE

Test	LoD C ₉₅ (pourcentage d'ADN mutant dans l'ADN de type sauvage)
12ALA	0,8
12ARG	2,6
12ASP	6,4
12CYS	1,5
12SER	5,6
12VAL	1,6
13ASP	6,4

CPNPC

La LoD pour les tests du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR a été déterminée et vérifiée à l'aide de tissu de CRC. Ces résultats de la LoD ont été vérifiés une seconde fois pour le tissu de CPNPC.

L'étude était constituée de 2 parties. Dans la Partie 1, 60 répliquats de 7 lignées cellulaires FFPE de CPNPC représentant chaque mutation ont été dilués à la LoD du test correspondant et testés. Les 60 répliquats valides de lignées cellulaires FFPE pour chaque échantillon évalué ont montré une détection de 100 % pour leur réaction de mutation respective à la LoD évaluée.

Dans la Partie 2, 96 répliquats d'échantillons cliniques FFPE de CPNPC, représentant chaque mutation pour les 3 méthodes d'acquisition (résection, BAT et BAAF), ont été testés après dilution à la LoD du test correspondant.

Les 96 répliquats valides pour 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL et 13ASP ont montré un taux de détection correcte de 100 %. Les tests pour 12CYS et 12SER ont montré un taux de détection de 95,8 % à la LoD.

Ceci démontre que la valeur de LoD précédemment déterminée est vérifiée pour tous les tests de mutation lors de l'évaluation d'échantillons de tissu CPNPC et d'échantillons FFPE cliniques de CPNPC/lignées cellulaires FFPE/échantillons de patients correspondants.

Entrée d'ADN et linéarité

Effet du niveau d'entrée d'ADN sur les valeurs ΔC_T

Lorsque des échantillons de niveaux totaux d'ADN différents contiennent la même proportion d'ADN mutant, les valeurs ΔC_T mesurées sont censées demeurer cohérentes. L'ADN extrait de 8 lignées cellulaires FFPE a été utilisé pour préparer des pools d'ADN avec le C_T de réaction de contrôle le plus faible possible.

L'intervalle de dilution pour chaque réaction de mutation et la valeur ΔC_T moyenne obtenue à partir des résultats sont indiqués dans les tableaux 15 et 16. Les valeurs ΔC_T globales sont concordantes sur l'ensemble de la plage de fonctionnement du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR pour tous les tests, ce qui démontre que le niveau d'ADN n'a aucune influence sur l'exactitude de la détection de mutations dans les échantillons.

Tableau 15. Effet de l'entrée d'ADN sur les valeurs ΔC_T au sein de l'intervalle C_T de la réaction de contrôle d'entrée - lignées cellulaires CRC FFPE

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

* Le nombre total de réplicats pour 12ASP s'élevait à 27.

Tableau 16. Effet de l'entrée d'ADN sur les valeurs ΔC_T au sein de l'intervalle C_T de la réaction de contrôle d'entrée - échantillons FFPE de CPNPC

Test	ΔC_T				
	Dilution 1 ~20-21 C_T	Dilution 2 ~23-24 C_T	Dilution 3 ~26-27 C_T	Dilution 4 ~29-30 C_T	Dilution 5 ~32-33 C_T
12ALA	3,40	3,25	3,11	2,90	3,31
12ASP	3,63	2,92	2,55	2,46	—*
12ARG	2,49	2,22	2,25	2,23	1,40
12VAL	1,34	1,23	1,18	1,13	0,97
12SER	5,34	4,50	4,30	3,92	—*
12CYS	1,70	1,71	1,70	1,77	1,01
13ASP	6,24	5,36	5,14	4,87	—*

* Aucun C_T de réaction de mutation obtenu en raison de la faible concentration de l'ADN, donc aucun ΔC_T n'a été calculé.

Linéarité/efficacité de l'amplification en fonction de l'entrée d'ADN

La linéarité et l'efficacité de l'amplification de la PCR ont été démontrées pour chaque réaction de mutation, par rapport à la réaction de contrôle, sur toute la plage de fonctionnement du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR. L'efficacité de l'amplification a été calculée pour chacune des réactions de mutation et pour la réaction de contrôle selon la formule $[2^{(-1/\text{pente})}] - 1$.

L'efficacité de l'amplification du contrôle comparée à la réaction de mutation indique que la valeur ΔC_T , et donc la détection de mutation, est cohérente pour toute la plage de fonctionnement du test. Les données sont reprises dans les tableaux 17 et 18.

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

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet d'échantillons positifs mutants dilués en série sur l'efficacité de l'amplification, sur toute la plage de fonctionnement du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR, à partir de niveaux d'entrée de C_T d'environ 22-23 C_T .

Les extraits d'ADN de lignées cellulaires FFPE de CRC et d'échantillons de CPNPC ont d'abord été évalués par la valeur de DO avant la réalisation de la PCR avec le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR. Les stocks d'ADN ont ensuite été préparés à un C_T de réaction de contrôle correspondant à environ 23 C_T . Les stocks ont été dilués en séries de deux à l'aide d'ADN de type sauvage, afin de maintenir constant le niveau total d'ADN de type sauvage tout en faisant varier le pourcentage d'ADN mutant dans la matrice.

Des pools d'ADN suffisants pour 6 réplicats par mutation ont été préparés. Les données de C_T et ΔC_T ont été calculées pour chaque mutation à chaque point de dilution. Un modèle de régression linéaire représente le C_T de la réaction de mutation par rapport au \log_2 de la dilution d'entrée d'ADN. L'étude a montré que la dilution des mutations dans un bruit de fond de concentration constante d'ADN de type sauvage avait abouti à une efficacité d'amplification ne variant pas de façon tangible hors des valeurs déterminées dans l'étude de linéarité ci-dessus.

Tableau 17. Efficacité de l'amplification dans les réactions de mutation et de contrôle : lignées cellulaires CRC

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

Échantillon

Tableau 18. Efficacité de l'amplification dans les réactions de mutation et de contrôle : échantillons de CPNPC

	Échantillon	Ordonnée à l'origine	Erreur standard d'ordonnée à l'origine	Pente calculée	Erreur standard (pente)	Limite de confiance bilatérale minimale à 95 % (pente)	Limite de confiance bilatérale maximale à 95 % (pente)	Efficacité de l'amplification	Différence d'efficacité de l'amplification
12ALA	C _T de contrôle	22,74	0,04	-0,15	0,02	-0,19	-0,11	0,94	0,069
	C _T 12ALA	24,11	0,16	-1,06	0,07	-1,20	-0,93	1,01	
12ARG	C _T de contrôle	21,92	0,03	-0,07	0,01	-0,09	-0,05	0,94	0,093
	C _T 12ARG	24,44	0,02	-0,98	0,01	-0,96	-0,96	1,04	
12ASP	C _T de contrôle	21,73	0,05	-0,13	-0,02	-0,17	-0,08	0,96	-0,001
	C _T 12ASP	22,69	0,03	-0,97	0,01	-1,00	-0,95	0,96	
12CYS	C _T de contrôle	21,73	0,04	-0,11	0,01	-0,14	-0,08	0,98	0,019
	C _T 12CYS	22,77	0,03	-1,01	0,01	-1,03	-0,99	1,00	
12SER	C _T de contrôle	22,03	0,05	-0,06	0,02	-0,10	-0,02	0,97	0,127
	C _T 12SER	25,34	0,03	-0,97	0,01	-0,99	0,94	1,09	
12VAL	C _T de contrôle	22,13	0,04	-0,03	0,02	-0,07	0,01	0,92	0,011
	C _T 12VAL	23,34	0,08	-0,95	0,03	-1,01	-0,88	0,91	
13ASP	C _T de contrôle	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	-0,04	0,94	0,066
	13ASPC _T	25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00	-0,88	1,01	

Substances interférentes

Cette étude visait à évaluer l'impact des substances potentiellement interférentes sur les performances du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR. Elle a été réalisée en analysant l'impact de chaque substance, via des procédés par ajout connu avec différentes concentrations, sur les valeurs ΔC_T et l'état de mutation des échantillons de test. Les substances potentiellement interférentes du processus d'extraction de l'ADN étaient les suivantes : tampon AL, tampon ATL, éthanol, cire de paraffine, protéinase K, tampon de lavage AW1, tampon de lavage AW2 et xylène. Le tampon d'élution final du kit, le tampon ATE, a également été testé en tant que contrôle à blanc.

Aux concentrations susceptibles d'être rencontrées dans le cadre d'une utilisation normale, aucune des substances potentiellement interférentes évaluées n'affecte la capacité du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR à distinguer les échantillons présentant une mutation (positifs) de ceux ne présentant pas de mutation (négatifs).

Outre l'étude des substances interférentes, l'effet potentiel de nécrose dans les échantillons cliniques a été évalué pour déterminer si de hauts niveaux de tissus nécrotiques dans les échantillons tumoraux pouvaient affecter la capacité à générer des données valides. Sur un total de 421 échantillons évalués dans le cadre d'études de comparaison avec la méthode de référence analytique, 29 présentaient une nécrose à un niveau > 50 %, selon l'examen pathologique. Parmi ces 29 échantillons, 28 ont présenté des résultats valides concordant avec le séquençage bidirectionnel Sanger. Un seul résultat s'est avéré invalide en raison d'une insuffisance d'ADN.

Contamination croisée

Cette étude visait à déterminer, à l'aide du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR, l'étendue de la contamination croisée entre les échantillons d'ADN, susceptible d'entraîner des faux positifs. Les sources potentielles de contamination croisée incluent :

- prélèvement d'échantillon (p. ex., grattage de lames) ;
- pipetage d'échantillons ;
- fermeture (« capping ») des tubes d'échantillon ;
- contamination des réactifs de kit lors de l'utilisation ;
- chargement des tubes à essai sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

Pour cette étude, des échantillons standard FFPE ont été utilisés : de type sauvage et 12ALA (la réaction du 12ALA étant celle avec la LoD la plus faible dans le kit).

L'étude consistait en 10 analyses PCR conçues pour étudier le potentiel de contamination au cours des analyses sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx et entre celles-ci. Lors de ces analyses de test, les tubes contenant de l'ADN de type sauvage ont été utilisés pour tester la contamination depuis un ADN mutant.

Les résultats de cette étude n'ont révélé aucune contamination détectable dans chacun des extraits d'ADN de type sauvage destinés à la détection d'une contamination croisée.

Exclusivité/réactivité croisée

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR est constitué de 8 réactions distinctes : une réaction de contrôle unique détectant une région non polymorphique du gène KRAS et 7 réactions spécifiques à la mutation. Aucune réaction ne mesure en particulier la séquence KRAS de type sauvage dans les codons 12 ou 13. Le résultat KRAS « No Mutation Detected » (aucune mutation détectée) (c.-à-d. de type sauvage) est déterminé par l'absence de l'une des 7 mutations entraînant un résultat de mutation positif.

Par conséquent, il est nécessaire de démontrer la quantité d'amplification non spécifique ou de réactivité croisée se produisant dans chaque réaction au moyen de quantités excessives d'ADN de KRAS de type sauvage afin d'éliminer tout faux positif. De la même manière, l'amplification non spécifique est évaluée pour les mutations KRAS que le test n'est pas censé détecter. Ceci démontre que la quantité de réactivité croisée entre les réactions mutantes n'entraîne pas d'erreur dans la détection des mutations en présence de quantités excessives d'ADN mutant. L'entrée d'ADN de ce test étant fondée sur l'intervalle C_T (21,92–32,00), la plus forte concentration d'entrée d'ADN est fondée sur une valeur C_T de contrôle d'environ 22.

Amplification non spécifique/réactivité croisée : ADN KRAS de type sauvage

La quantité d'amplification non spécifique d'ADN de type sauvage par des mélanges réactionnels conçus pour amplifier les mutations spécifiques a été traitée. Au total, 60 répliquats d'ADN de lignées cellulaires FFPE de type sauvage et 60 échantillons de CPNPC ont été évalués à la concentration maximale de niveau d'entrée d'ADN amplifiable à l'aide du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR.

Les valeurs C_T de contrôle étaient d'environ 22-23. Les résultats ont montré que les valeurs ΔC_T dépassaient les seuils établis et qu'au moins 95 % des réplicats de type sauvage étaient correctement détectés.

Amplification non spécifique/réactivité croisée/exclusivité : ADN KRAS positif à la mutation

Les échantillons mutants ayant une forte concentration d'ADN d'entrée ont été soumis à tous les mélanges réactionnels. Les échantillons d'ADN ont été préparés à partir de chacune des lignées cellulaires FFPE de CRC et de CPNPC de façon que la valeur C_T de la réaction de contrôle corresponde approximativement à 23. À partir de ces dilutions, 6 réplicats de chaque échantillon de mutation ont été préparés. Le pourcentage de mutation de l'échantillon était régi par le pourcentage de mutants dans l'ADN des lignées cellulaires.

Les valeurs ΔC_T moyennes présentées dans les tableaux 19 et 20 démontrent une réactivité croisée entre les réactions de mutation. Dans tous les cas, les résultats démontrent que la mutation correcte a été détectée avec la réaction de mutation correspondante (la valeur ΔC_T la plus faible représentait la détection de mutation correcte). Dans tous les autres cas de tests, les mutations n'étaient pas détectées ou se situaient en dehors du seuil ΔC_T .

Tableau 19. Réactivité croisée (ΔC_T) entre les réactions de mutation au moyen d'ADN de lignées cellulaires CRC FFPE dans l'intervalle d'entrée élevé

ADN mutant	Seuil	ΔC_T du test						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1,42*	12,66	NA	5,81†	2,78†	6,31†	13,21
12ASP	6,6	12,56	2,42*	NA	NA	13,44	11,21	13,55
12ARG	8	13,12	11,56	1,12*	11,42	NA	13,43	12,66
12CYS	8	14,2	12,48	9,23	0,98*	NA	7,96†	12,88
12SER	8	NA	13,39	13,31	NA	3,02*	12,99	13,97
12VAL	7,5	6,83†	NA	NA	NA	13,38	0,28*	13,74
13ASP	7,5	NA	13,29	13,89	NA	NA	14,36	4,5*

NA : Absence de réaction croisée.

* Valeurs ΔC_T des réactions correspondantes.

† ΔC_T des réactions croisées au-dessous du seuil.

Tableau 20. Réactivité croisée (ΔC_T) entre les réactions de mutation au moyen d'ADN de lignées cellulaires FFPE de CPNPC dans l'intervalle d'entrée élevé

ADN mutant	Seuil	ΔC_T du test						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1,31*	12,8	NA	5,01[†]	2,26[†]	5,57[†]	12,65
12ASP	6,6	12,61	1,66*	NA	NA	NA	10,3	12,60
12ARG	8	12,98	11,08	0,81*	11,24	NA	12,66	12,62
12CYS	8	NA	12,22	7,84[†]	0,56*	NA	13,06	11,84
12SER	8	NA	12,87	13,21	NA	1,93*	13,25	12,93
12VAL	7,5	5,93[†]	14,29	NA	NA	13,14	0,45*	12,39
13ASP	7,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,02*

NA : Absence de réaction croisée.

* Valeurs ΔC_T des réactions correspondantes.

[†] ΔC_T des réactions croisées au-dessous du seuil.

Répétabilité et reproductibilité

Les objectifs de cette étude étaient de démontrer la précision intralaboratoire (répétabilité) et interlaboratoire (reproductibilité) du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR. Le caractère correct des résultats de détection de la mutation et la précision des valeurs ΔC_T (différence des valeurs C_T entre une réaction de mutation et la réaction de contrôle) sont indiqués.

CRC

Des échantillons cliniques de CRC ont été utilisés pour cette évaluation. Un ADN de type sauvage et un échantillon pour chaque mutation ont été testés avec le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR : 2 opérateurs travaillant sur chacun des 3 sites ont testé tous les échantillons et les contrôles sur 3 lots de kits *therascreen* KRAS RGQ PCR, chaque jour pendant 5 jours, à raison de 2 analyses par jour avec 2 réplicats par échantillon pour chaque analyse. Les valeurs C_T et ΔC_T obtenues pour chaque réaction dans chaque échantillon ont également été évaluées par une analyse de composante de variance.

Des échantillons mutants de faible niveau ($3 \times \text{LoD}$) et des échantillons de type sauvage ont permis de mettre en évidence la reproductibilité du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR, avec au moins 39/40 détections de mutation correctes, dans

chacun des tests avec de multiples lots, instruments et opérateurs, tant au cours des expériences de laboratoire qu'entre celles-ci. La proportion estimée d'échantillons 3 × LoD testant les échantillons mutants et de type sauvage a été rapportée de manière générale et pour chacun des sites. Pour tous les tests et toutes les combinaisons d'échantillons, au moins 79 réplicats sur 80 ont présenté la détection de mutation correcte (tableau 21).

Tableau 21. Détections correctes globalement

Échantillon	Détections correctes des tests de mutation						
	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Mutant 3 × LoD	79/80	80/80	80/80	79/80	80/80	80/80	80/80
Type sauvage (faible)	80/80	79/80	80/80	80/80	79/80	79/80	80/80

CPNPC

Pour chacune des 7 mutations KRAS de CPNPC, 3 échantillons représentant chacun des trois types de méthodes d'acquisition (résection, BAT et BAAF) ont été utilisés. En outre, 6 échantillons cliniques supplémentaires de type sauvage (avec 2 échantillons pour chacun des 3 types de méthodes d'acquisition) ont été utilisés pour créer des pools de diluant d'ADN de type sauvage.

Les différents extraits ont été mis en pools pour chaque échantillon de mutation afin de créer un pool unique d'échantillons par mutation. Chaque pool d'échantillons de mutation a été dilué afin de générer des échantillons de test à des niveaux de mutation de 1 × LoD et 3 × LoD.

Les laboratoires participant à cette étude étaient sur 3 sites différents. Les conditions de laboratoire variaient sur chaque site par l'utilisation de 2 instruments Rotor-Gene Q MDx, de 2 opérateurs, de 2 lots du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR et de 2 analyses par jour (par opérateur) sur 16 jours non consécutifs.

Pour tous les tests et toutes les combinaisons d'échantillons, au moins 284 réplicats sur 288 ont présenté la détection de mutation correcte. La proportion globale de détections correctes, sur tous les tests combinés, pour le groupe 1 × LoD, était de 100 %. La proportion globale de détections correctes, sur tous les tests combinés, pour le groupe 3 × LoD, était de 99,6 %. La

proportion globale de détections correctes pour les échantillons n'ayant pas présenté de détection de mutation (type sauvage) était de 100 % (tableau 22).

Tableau 22. Détections correctes pour 1 × LoD, 3 × LoD et pour le type sauvage

Niveau de mutation	Test	Lectures correctes	Lectures correctes, %	IC à 90 % bilatéral minimal
1 × LoD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/284	100	96,85
	12SER	284/284	100	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	288/288	100	98,97
3 × LoD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/288	98,61	96,85
	12SER	284/288	98,61	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	287/287	100	98,96
Type sauvage		285/285	100	98,95

Variabilité liée à la manipulation des échantillons

Cette étude visait à évaluer l'effet de la variabilité liée à la manipulation des échantillons, en particulier l'extraction de l'ADN, sur le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR. Cette étude complète l'étude de répétabilité et de reproductibilité en analysant la variabilité de manipulation des échantillons lorsque les mêmes sections de FFPE et de lignées cellulaires FFPE étaient traitées sur 3 sites, puis testées avec le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR.

CRC

Trente coupes séquentielles de 5 µm ont été prélevées sur chacun des 10 échantillons FFPE de CRC (3 de type sauvage et 1 par mutation). Les coupes ont été randomisées dans 1 des 3 sites de test de telle sorte que chaque site a reçu 10 coupes par échantillon FFPE (100 coupes au total). Sur les 300 extractions d'ADN testées, 298 échantillons étaient valides. La concordance des détections de mutation KRAS entre les 3 sites s'élevait à 99,33 %.

Une comparaison par site des valeurs ΔC_T moyennes pour les échantillons mutants et de type sauvage a révélé une très nette concordance des résultats. Les résultats révèlent la concordance de la procédure d'extraction de l'ADN et du traitement des échantillons conjointement avec le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR.

CPNPC

Dans cette étude, 13 échantillons cliniques de CPNPC (3 × 12ASP, 3 × 12CYS, 4 × 12VAL et 3 de type sauvage) et 4 échantillons de lignées cellulaires FFPE (12ALA, 12ARG, 12SER et 13ASP) ont été utilisés. Les échantillons représentaient les différentes méthodes d'acquisition : résection chirurgicale, BAAF et BAT. Des lignées cellulaires ont été utilisées pour représenter les mutations rares pour lesquelles aucun tissu clinique de CPNPC n'était disponible.

Les 3 lots de 20 sections FFPE ont ensuite été distribués de façon aléatoire entre les 3 sites. Sur chacun des 3 sites, l'extraction de l'ADN a été réalisée sur un lot de 20 sections FFPE (10 paires) par mutation et type sauvage.

Lorsque toutes les préparations d'échantillons sur les 3 sites de test individuels ont été testées avec le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR, chacune des 7 mutations et chacun des échantillons de type sauvage ont été identifiés avec la détection de mutation correcte. La détection globale pour chacune des 7 mutations et les échantillons de type sauvage était de 100 %, ce qui démontre la cohérence inter-site pour l'extraction de l'ADN et la détection de la mutation à l'aide du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR.

Équivalence des méthodes d'acquisition des échantillons (CPNPC uniquement)

L'objectif de cette étude était d'évaluer si la détection de la mutation pour les échantillons de CPNPC déterminée par le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR était affectée par la méthode d'acquisition des échantillons. Les 3 méthodes d'acquisition évaluées dans cette étude sont la résection, la BAAF et la BAT.

Pour cette étude, des échantillons de BAT et de BAAF de patients correspondants ont été dérivés à partir d'échantillons tumoraux obtenus par résection chirurgicale afin de permettre de prélever la même tumeur par les 3 méthodes d'acquisition. Au total, 169 échantillons de résection, 169 échantillons de BAT et 169 échantillons de BAAF étaient disponibles pour cette étude.

Chaque échantillon a été extrait et testé avec le test de contrôle KRAS. Chaque échantillon donnant un résultat valide (169 résections, 169 BAT et 164 BAAF) a été testé dans en tout 8 tests KRAS.

En outre, pour chacun des échantillons FFPE cliniques de CPNPC, l'ADN extrait utilisé pour l'analyse sur le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR a également été évalué par séquençage bidirectionnel Sanger afin de déterminer le niveau de concordance entre le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR et le séquençage bi-directionnel Sanger. Pour tous les types d'échantillons, le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR détermine de manière exacte l'état mutationnel par rapport au séquençage bidirectionnel Sanger avec un pourcentage de concordance globale de 96,96 %.

Les résultats de cette étude démontrent que le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR fournit des résultats équivalents pour les 3 méthodes de prélèvement étudiées, comme l'indiquent les taux de concordance globale par paire (pourcentage) :

- BAT par rapport à BAAF 97,52 (limites de confiance 94,41 à 99,15)
- BAT par rapport à résection 96,39 (limites de confiance 92,99 à 98,41)
- BAAF par rapport à résection 98,76 (limites de confiance 96,14 à 99,78)

Références

Références citées

1. Hilger, R.A., et al. (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* **25**, 511.
2. Bachiredy, P., et al. (2005) Getting at MYC through RAS. *Clin. Cancer Res.* **11**, 4278.
3. Han, S.-W. et al. (2006) Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and AKT phosphorylation. *Clin. Cancer Res.* **12**, 2538.
4. Pao, W. et al. (2005) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PloS Medicine* **2**, 57.
5. Newton, C.R. et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* **17**, 2503.
6. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* **17**, 804.
7. Catalog of Somatic Mutations in Cancer:
www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline. CLSI Document EP17-A*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Références utiles

Amado, R.G. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1626.

Benvenuti, S. et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* **67**, 2643.

Bokemeyer, C. et al., (2008) K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl; abstr 4000).

- Chaft, J.E. et al. (2013) Phase II trial of neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy and adjuvant bevacizumab in patients with resectable nonsquamous non-small-cell lung cancers. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1084.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP05-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
- De Roock, W. et al. (2007) KRAS mutations preclude tumor shrinkage of colorectal cancers treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4132.
- De Roock, W. et al. (2008) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann. Oncol.* **19**, 508.
- Di Fiore, F. et al. (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br. J. Cancer* **96**, 1166.
- Dingemans, A.M. et al. (2013) A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIb or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. *Clin. Cancer Res.* **3**, 743.
- Finocchiaro, G. et al. (2007) EGFR, HER2, and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4021.
- Jänne, P.A. et al. (2013) Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **1**, 38.
- Karapetis C. et al. (2008) KRAS mutation status is a predictive biomarker for cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG CO.17: A phase III trial of cetuximab versus best supportive care. 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer: Abstract o-037. Presented June 27, 2008.
- Khambata-Ford, S. et al. (2007) Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3230.

Lièvre A. et al. (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **26**, 374.

Lievre, A. et al. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 3992.

Reckamp, K.L. et al. (2014) A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. *Cancer.* **120**, 1145.

Tejpar, S. et al. (2008) Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J. Clin. Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 4001).

Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.

Van Cutsem, E. et al. (2008) K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 2).

Symboles

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



<N>

Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions



À utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*



Numéro de référence



Numéro de lot



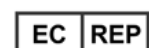
Numéro de matériel



Contient



Nombre



Représentant agréé

Rn

R indique qu’il s’agit d’une révision du manuel et n indique le numéro de révision



Limite de température



Fabricant



Consulter les instructions d’utilisation



Avertissement

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**, 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**).

Annexe 1 : Protocole manuel du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR

Cette section contient des instructions d'utilisation du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR avec le logiciel RGQ version 2.3 en mode ouvert (sans le KRAS Assay Package).

Informations générales

- Pour connaître le matériel nécessaire, consulter la section « Matériel nécessaire mais non fourni », page 11.
- Pour des instructions détaillées sur la préparation et la disposition des échantillons, voir « Protocole : évaluation des échantillons d'ADN », page 16, et « Protocole : détection des mutations KRAS », page 30.

Protocole : Création d'un profil de température

Avant de commencer, créer un profil de température pour l'analyse KRAS. Les paramètres de cycle sont les mêmes pour l'évaluation de l'échantillon et l'évaluation de la mutation.

Procédure

Les paramètres de cycle sont indiquées dans le tableau 23.

Tableau 23. Paramètres de cycle

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

1. Double-cliquer sur l'icône du logiciel Rotor-Gene Q Series Software 2.3 sur le bureau de l'ordinateur portable connecté à l'instrument Rotor-Gene Q MDx. Sélectionner l'onglet « Advanced » (avancé) dans la boîte de dialogue « New Run » (nouvelle analyse) qui apparaît.
2. Pour créer un nouveau modèle, sélectionner « Empty Run » (analyse vide) puis cliquer sur « New » (nouvelle) pour ouvrir le « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse).

3. 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 21).

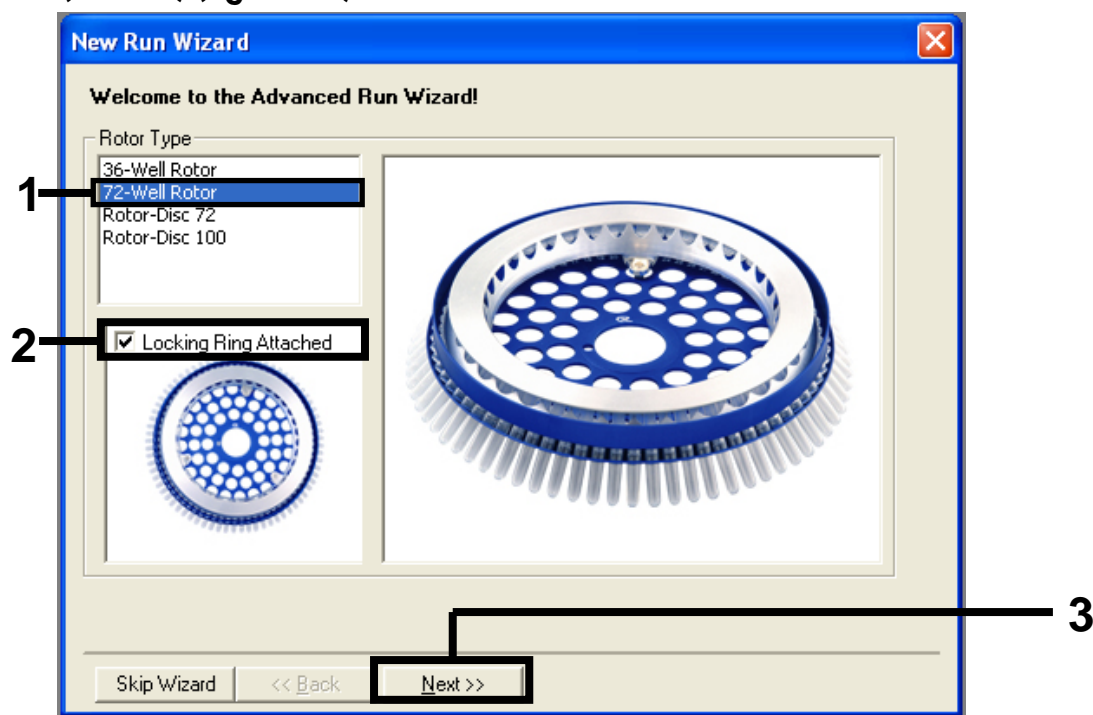


Figure 21. Boîte de dialogue « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse). 1 = « Rotor Type » (type de rotor), 2 = case « Locking Ring Attached » (bague de fermeture fixée), 3 = « Next » (suivant).

4. Saisir le nom de l'opérateur. Ajouter toutes les remarques et définir le volume réactionnel sur 25. S'assurer que « Sample Layout » (disposition d'échantillon) affiche « 1, 2, 3... ». Cliquer sur « Next » (suivant) (figure 22).

The image shows a software window titled "New Run Wizard" with a blue title bar and a close button. The window contains several input fields and a help box. Numbered annotations point to specific elements:

- 1** points to the "Operator:" label and the text input field containing "NAME".
- 2** points to the "Notes:" label and the large text area below it.
- 3** points to the "Reaction Volume (ul):" label and the spinner control set to "25".
- 4** points to the "Sample Layout:" label and the dropdown menu showing "1, 2, 3...".
- 5** points to the "Next >>" button at the bottom right.

Other visible elements include a "Skip Wizard" button, a "<< Back" button, and a yellow help box on the right with text: "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 22. Entrer le nom de l'opérateur et les volumes réactionnels. 1 = champ « Operator » (opérateur), 2 = champ « Notes » (remarques), 3 = champ « Reaction Volume » (volume réactionnel), 4 = « Sample Layout » (disposition d'échantillon), 5 = « Next » (suivant).

5. Cliquer sur le bouton « Edit Profile » (modifier profil) dans la boîte de dialogue « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse) (Figure 23) puis programmer le profil de température conformément aux informations contenues dans les étapes suivantes.

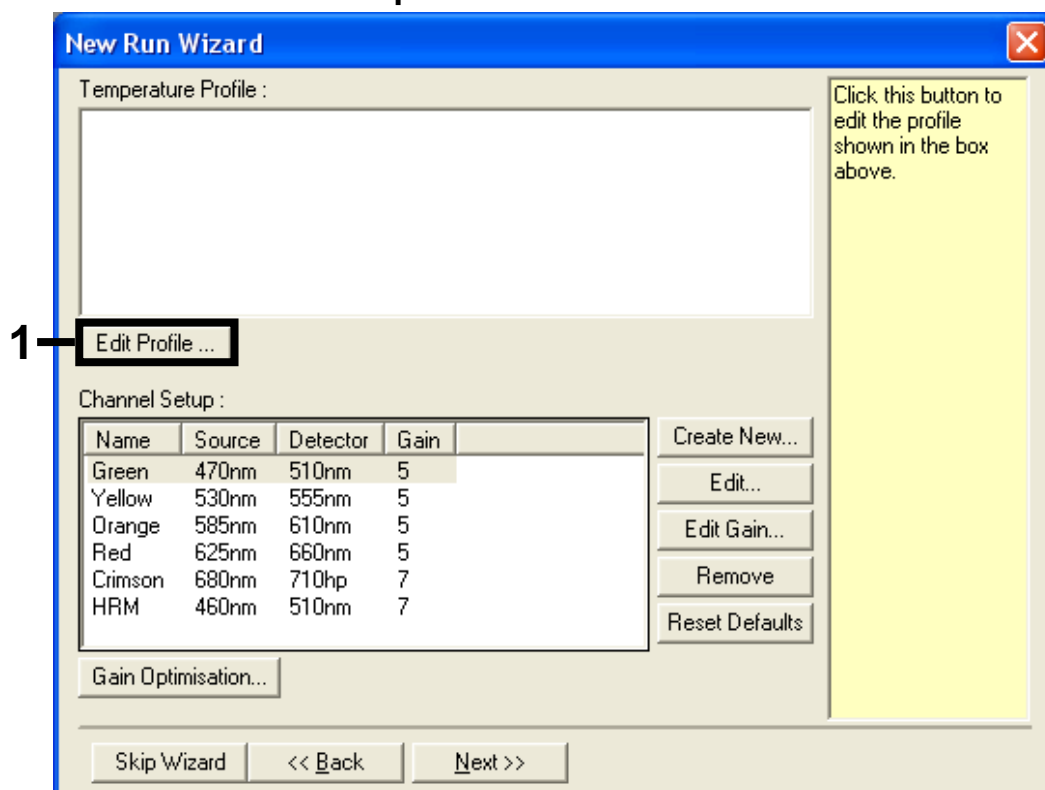


Figure 23. Modification du profil.

6. Cliquer sur le bouton « Insert after » (insérer après) puis sélectionner « New Hold at Temperature » (nouvelle température d'attente) (figure 24).

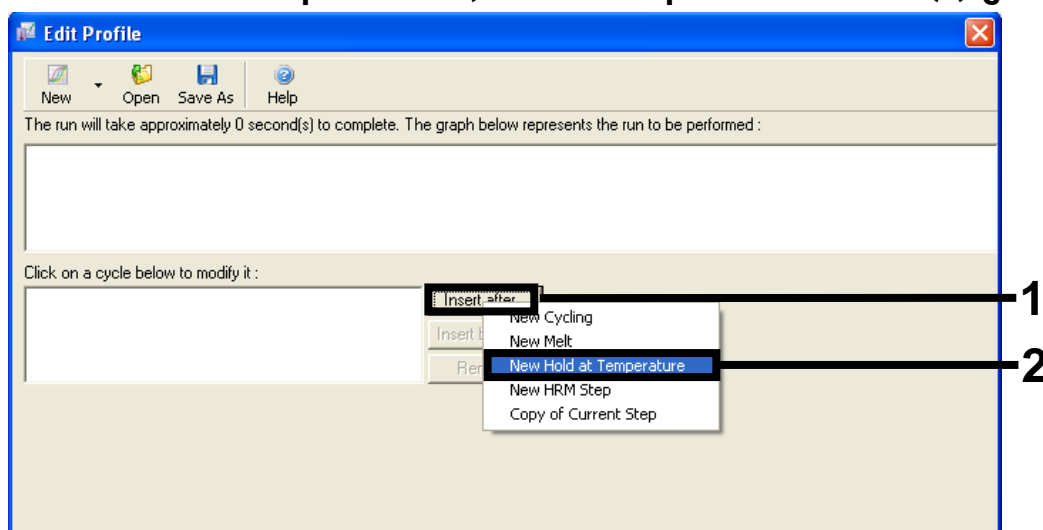


Figure 24. Insertion d'une étape d'incubation initiale. 1 = « Insert after » (insérer après), 2 = « New Hold at Temperature » (nouvelle température d'attente).

7. Régler « Hold Temperature » (température d'attente) sur 95 °C et « Hold Time » (temps d'attente) sur 15 min 0 sec. Cliquer sur « Insert After » (insérer après) puis sélectionner « New Cycling » (nouveau cycle) (figure 25).

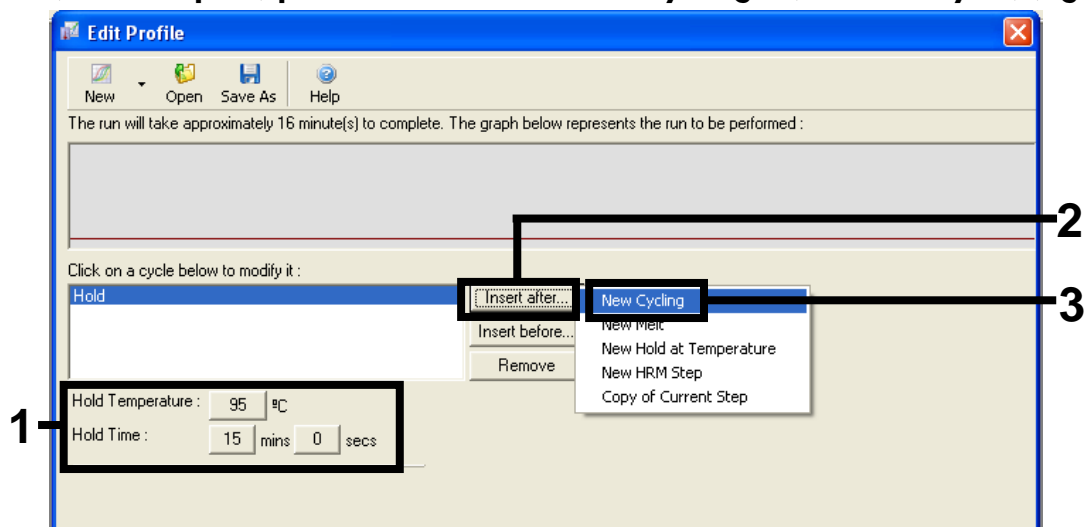


Figure 25. Étape d'incubation initiale à 95 °C. 1 = « Hold Temperature » (température d'attente) et « Hold Time » (temps d'attente), 2 = « Insert after » (insérer après), 3 = « New Cycling » (nouveau cycle).

8. Régler le nombre de répétitions de cycles sur 40. Sélectionner la première étape et régler sur 95 °C et sur 30 secondes (figure 26).

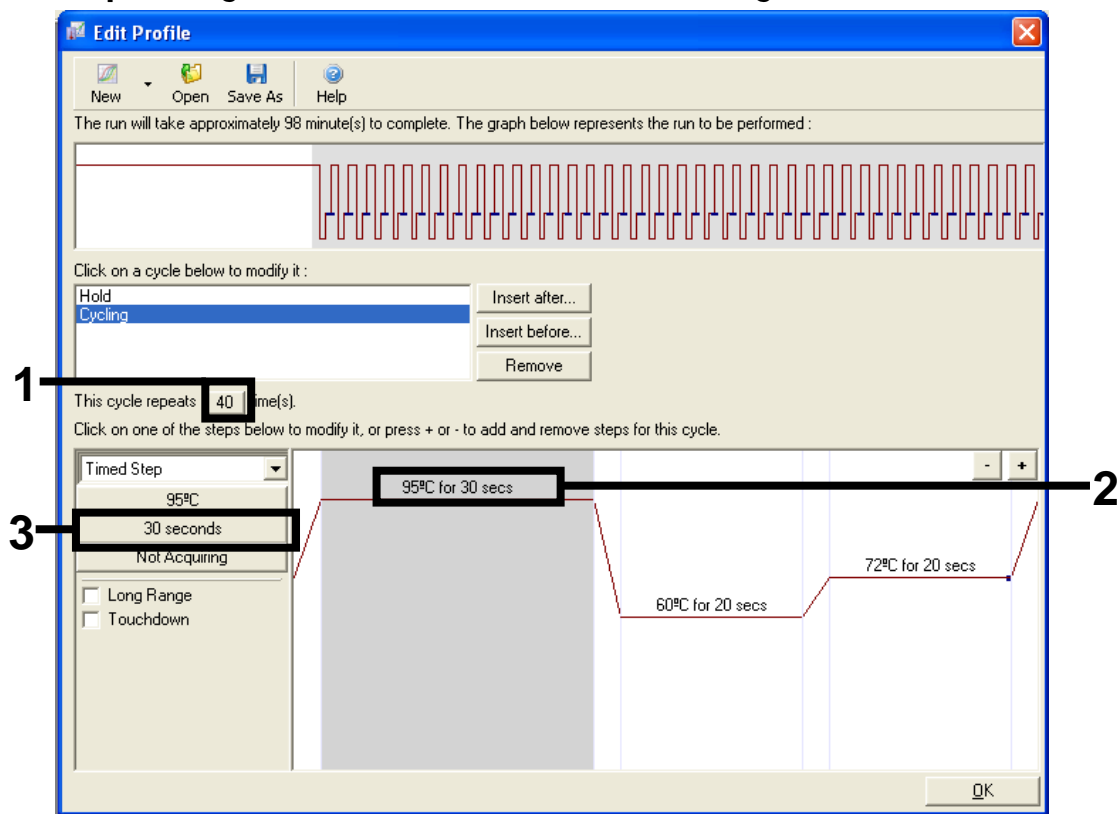


Figure 26. Étape du cycle à 95 °C. 1 = case de répétition de cycles, 2 = paramètre de température pour l'étape 1, 3 = paramètre de temps pour l'étape 1.

9. 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 27).

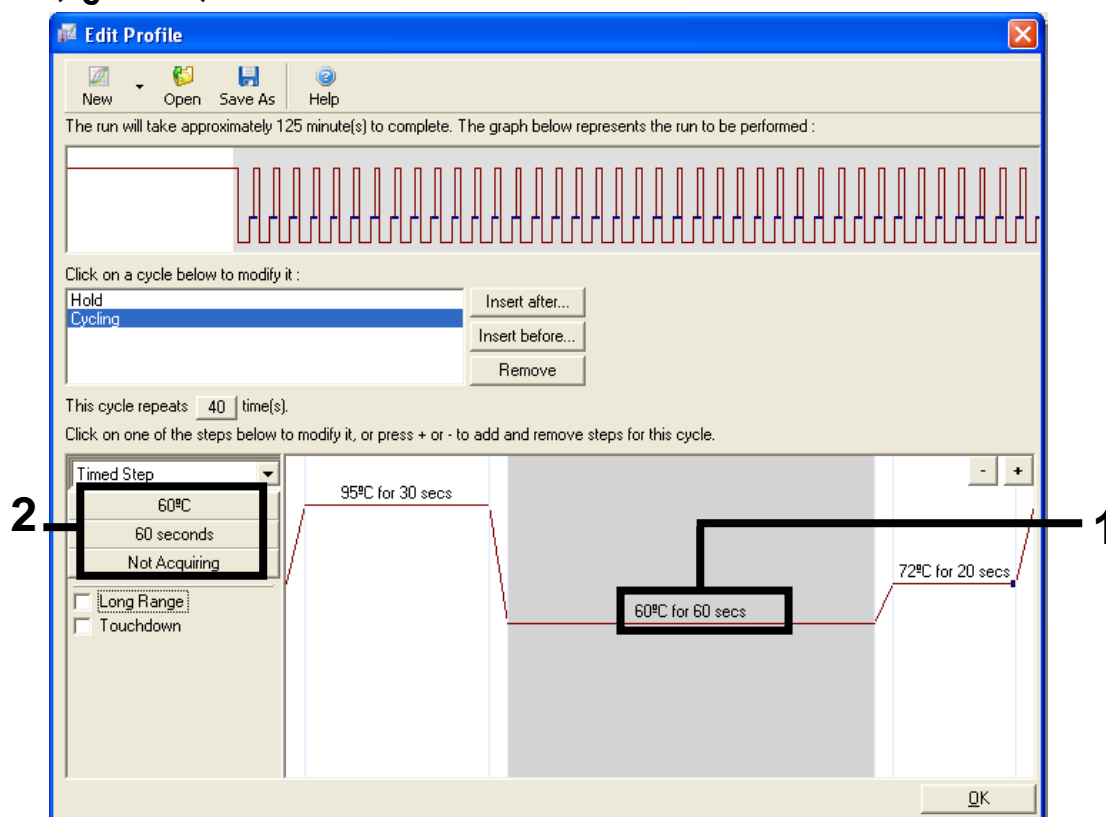


Figure 27. Étape du cycle à 60 °C. 1 = paramètres de temps et de température pour l'étape 2, 2 = « Not Acquiring » (pas d'acquisition).

Régler « Green » (vert) et « Yellow » (jaune) comme « Acquiring Channels » (canaux d'acquisition) en sélectionnant « > » pour les transférer depuis la liste « Available Channels » (canaux disponibles). Cliquer sur « OK » (figure 28).

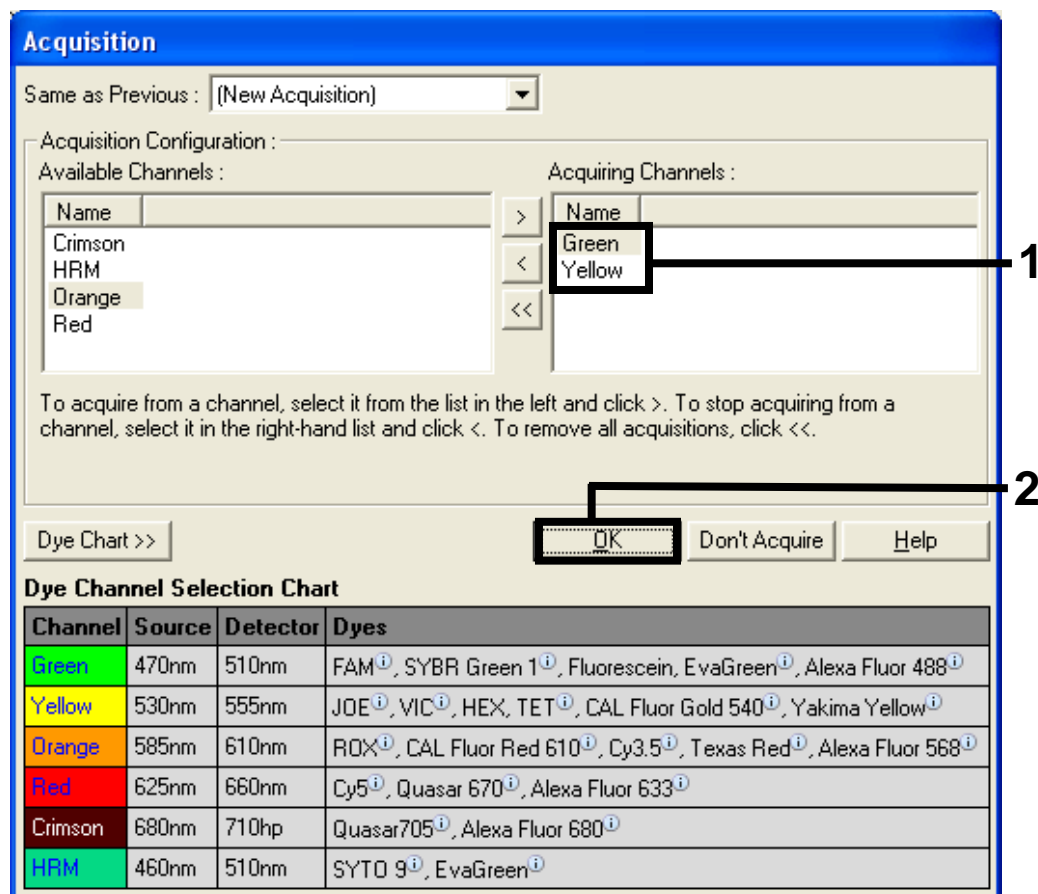


Figure 28. Acquisition à l'étape du cycle à 60 °C.

10. Mettre la troisième étape en surbrillance et la supprimer en cliquant sur « - ». Cliquer sur « OK » (figure 29).

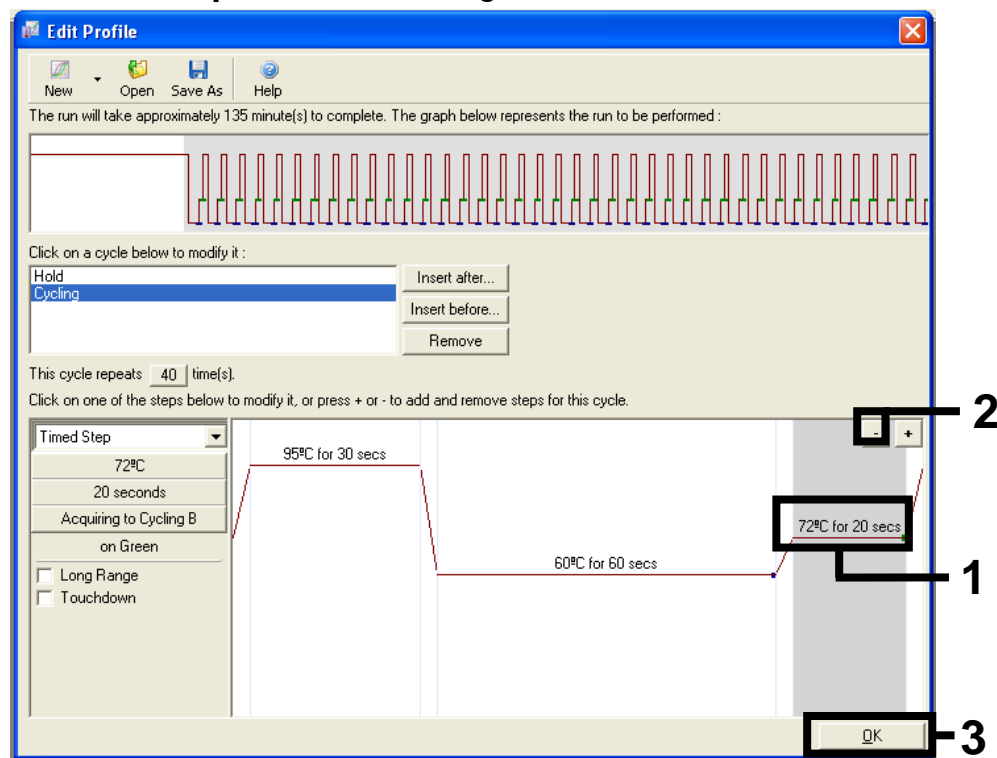


Figure 29. Suppression de l'étape supplémentaire.

11. Dans la boîte de dialogue suivante, cliquer sur « Gain Optimisation » (optimisation de l'augmentation) (figure 30).

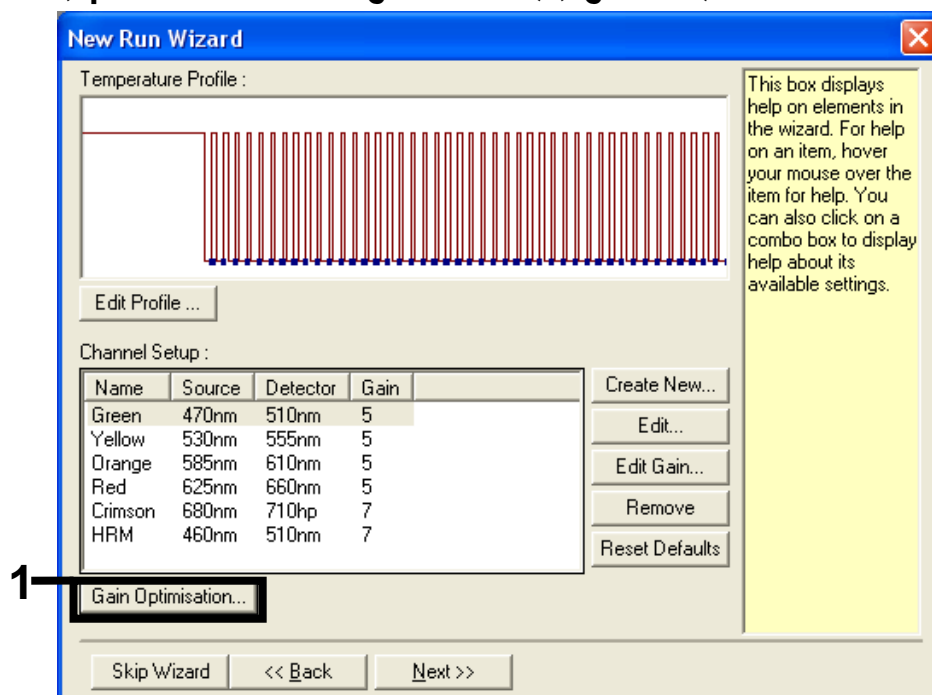


Figure 30. Optimisation de l'augmentation.

12. Cliquer sur « 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 31).

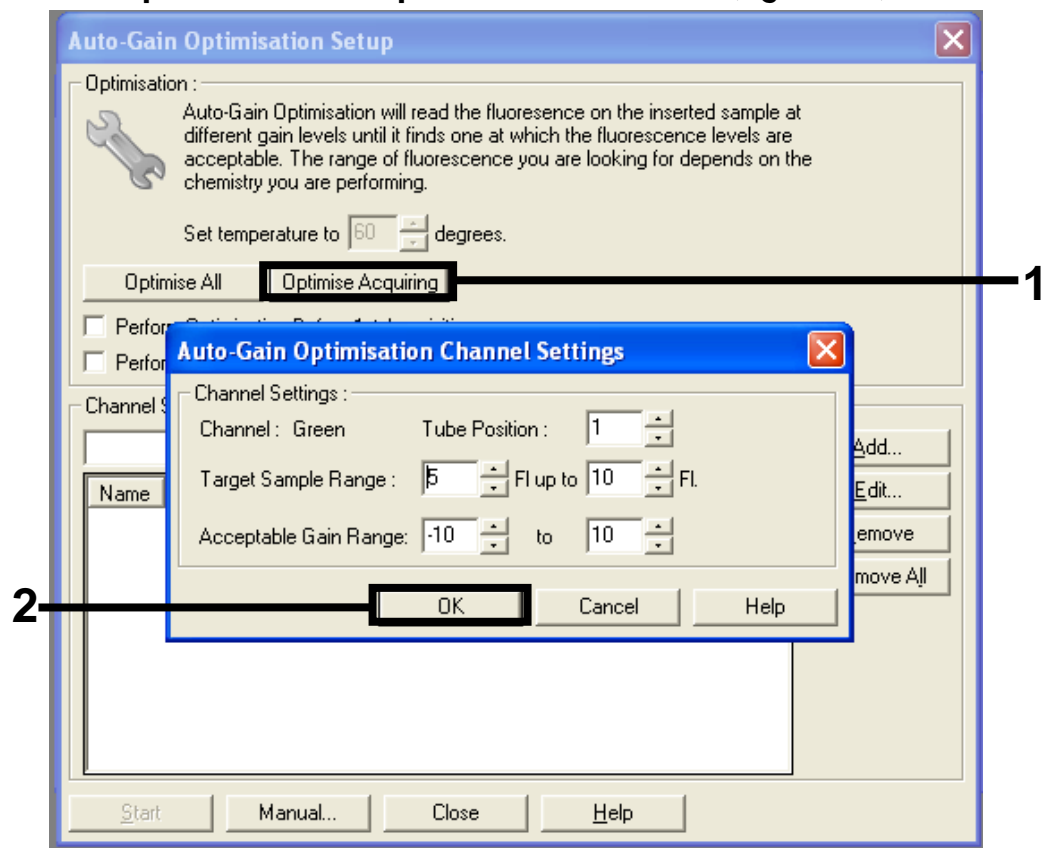


Figure 31. Optimisation automatique de l'augmentation pour le canal vert.

13. Cocher la case « Perform Optimisation before 1st Acquisition » (effectuer optimisation avant 1^{ère} acquisition) puis cliquer sur « Close » (fermer) pour retourner dans l'assistant (figure 32).

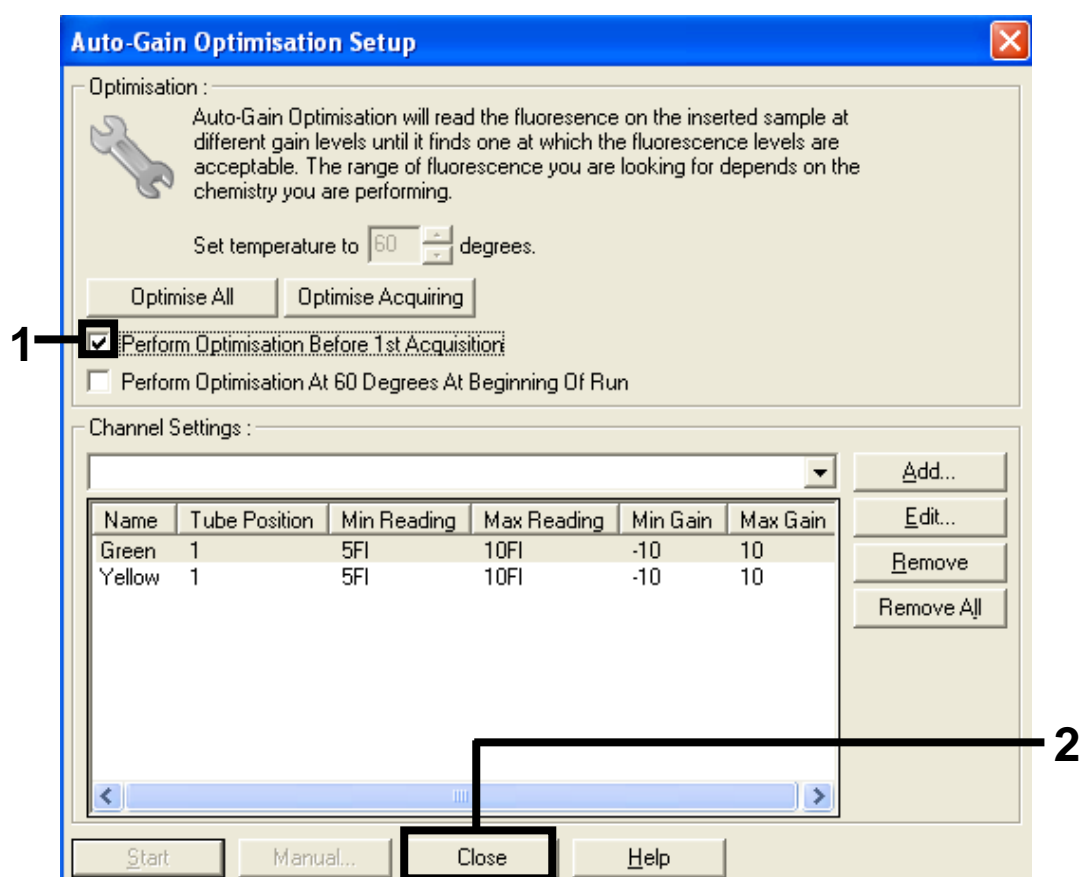


Figure 32. Sélection des canaux vert et jaune.

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

Protocole : Évaluation de l'échantillon (manuelle)

Ce protocole est utilisé pour évaluer l'ADN total amplifiable dans les échantillons et devrait être effectué avant l'analyse des mutations KRAS.

- Préparer les échantillons comme décrit à la section « Protocole : évaluation des échantillons d'ADN », page 16.
- Configurer l'analyse PCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx comme décrit à la section « Protocole : Configuration du kit *therascreen* KRAS PCR RGQ », page 86.
- Une fois l'analyse terminée, analyser les données conformément aux instructions de la section « Analyse des données d'évaluation de l'échantillon », page 90.

Protocole : Détection des mutations KRAS (manuelle)

Une fois l'évaluation de l'échantillon réussie, ce dernier peut être testé pour la détection des mutations KRAS.

- Préparer les échantillons comme décrit à la section « Protocole : détection des mutations KRAS », page 30.
- Configurer l'analyse PCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx comme décrit à la section « Protocole : Configuration du kit *therascreen* KRAS PCR RGQ », page 86.
- Une fois l'analyse terminée, analyser les données conformément aux instructions de la section « Analyse de la détection des mutations KRAS », page 91.

Protocole : Configuration du kit *therascreen* KRAS PCR RGQ

1. Ouvrir le logiciel Rotor-Gene Q series 2.3 et le profil de température approprié créé.

Créer le profil de température conformément à « Protocole : Création d'un profil de température », page 76.

2. S'assurer que le bon rotor est sélectionné et cocher la case confirmant que la bague de fermeture est bien fixée. Cliquer sur « Next » (suivant) (figure 33).

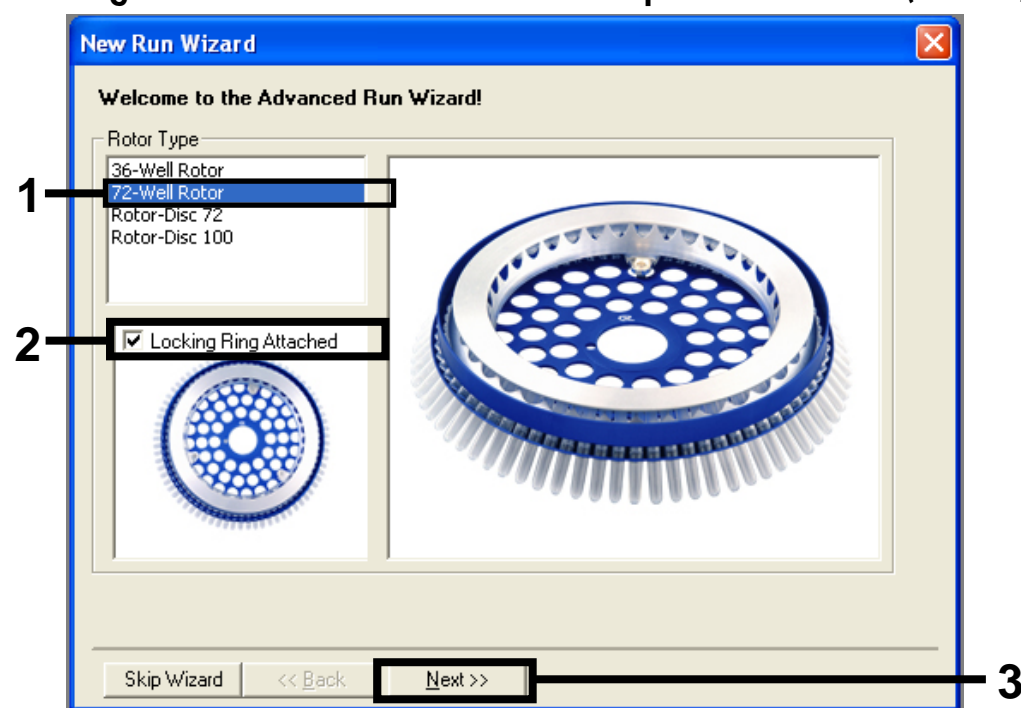


Figure 33. Boîte de dialogue « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse) et écran d'accueil. 1 = « Rotor Type » (type de rotor), 2 = case « Locking Ring Attached » (bague de fermeture fixée), 3 = « Next » (suivant).

3. Saisir le nom de l'opérateur. Ajouter toutes les remarques, vérifier que le volume réactionnel est réglé sur 25 et que la boîte de dialogue « Sample Layout » (disposition d'échantillon) affiche « 1, 2, 3... ». Cliquer sur « Next » (suivant) (figure 34).

The screenshot shows the 'New Run Wizard' dialog box. It has a title bar with a close button. The main area contains several fields: 'Operator' with a text input containing 'NAME', 'Notes' with a large text area, 'Reaction Volume (µL)' with a numeric input set to 25, and 'Sample Layout' with a dropdown menu showing '1, 2, 3...'. At the bottom are three buttons: 'Skip Wizard', '<< Back', and 'Next >>'. A yellow help box on the right side contains text explaining that hovering over items or clicking the combo box displays help. Numbered callouts 1, 2, and 3 point to the Operator field, the Notes/Reaction Volume area, and the Next button respectively.

Figure 34. Boîte de dialogue « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse). 1 = champ « Operator » (opérateur), 2 = champ « Notes » (remarques), 2 = champs « Reaction Volume » (volume réactionnel) et « Sample Layout » (disposition d'échantillon), 3 = « Next » (suivant).

4. La fenêtre suivante permet de modifier le profil de température. Aucune modification n'est nécessaire si le profil est créé conformément aux instructions figurant dans la section « Protocole : Création d'un profil de température », page 76. Cliquer sur « Next » (suivant) (figure 35).

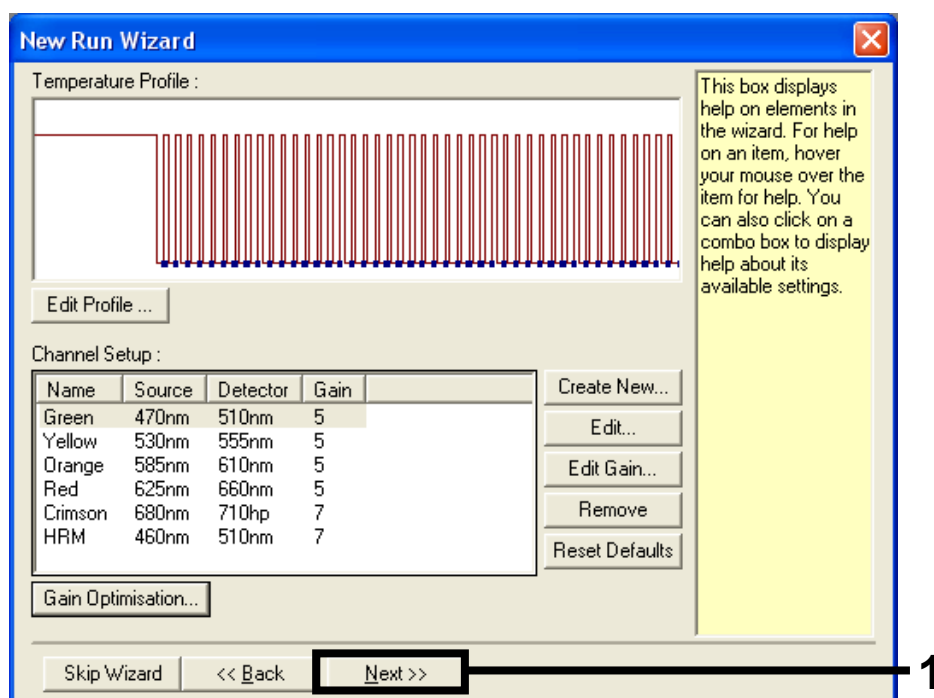


Figure 35. Boîte de dialogue « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse) et écran de modification de la température. 1 = « Next » (suivant).

5. Vérifier le résumé puis cliquer sur « Start Run » (démarrer analyse) pour sauvegarder le fichier d'analyse et démarrer l'analyse (figure 36).

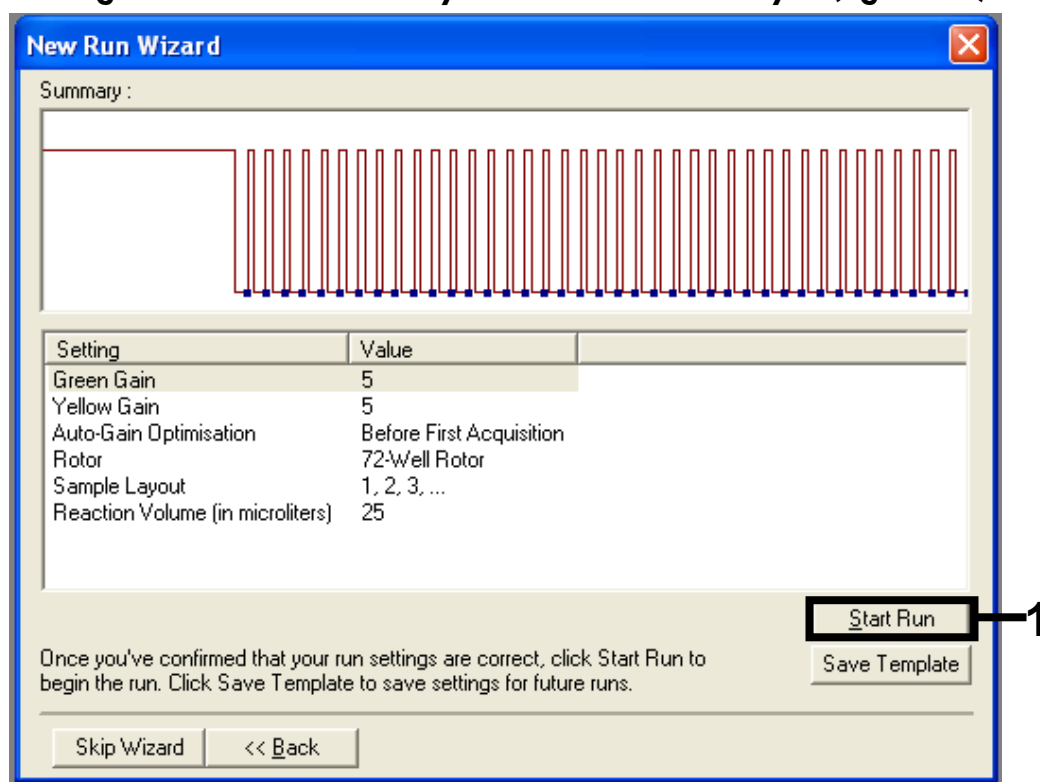


Figure 36. Boîte de dialogue « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse). 1 = « Start Run » (démarrer l'analyse).

6. 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.

Le fait de cliquer sur « Finish and Lock Samples » (terminer et verrouiller les échantillons) empêche toute modification du nom des échantillons. L'utilisateur doit être particulièrement vigilant lors de la saisie des noms d'échantillon pour garantir l'analyse des échantillons appropriés.

Remarque : lors de l'attribution des noms, les puits vides doivent être laissés vierges dans la colonne « Name » (nom).

7. Une fois l'analyse terminée, analyser les données conformément aux sections « Analyse des données d'évaluation de l'échantillon », page 90 ou « Analyse de la détection des mutations KRAS », page 91.
8. Si des rapports de quantification sont nécessaires, cliquer sur l'icône « Reports » (rapports) dans la barre d'outils du fichier d'analyse Rotor-Gene Q.

Interprétation des résultats (manuelle)

Une fois l'évaluation de l'échantillon ou l'analyse de la mutation 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 series, version 2.3.
2. Si l'attribution des noms des échantillons n'a pas encore été effectuée avant de procéder à l'analyse, cliquer sur « Edit Samples » (modifier échantillons).
3. Insérer les noms de vos échantillons dans la colonne « Name » (nom).
4. Cliquer sur « Analysis » (analyse). Sur la page de l'analyse, cliquer sur « Cycling A, Yellow » (cycle A, jaune) pour afficher le canal HEX.
5. Cliquer sur « Named On » (nommé).

Remarque : cela empêche les puits vides de figurer dans l'analyse.

6. Sélectionner « Dynamic Tube » (tube dynamique).
7. Sélectionner « Linear Scale » (échelle linéaire).
8. Cliquer sur « Outlier Removal » (suppression des aberrations) et saisir « 10% » pour le champ « NTC Threshold » (seuil du NTC).
9. Régler le seuil sur 0,05 puis vérifier les valeurs C_T de HEX.

10. Sur la page de l'analyse, cliquer sur « Cycling A, Green » (cycle A, vert) pour afficher le canal FAM.
11. Vérifier que « dynamic tube » (tube dynamique) est mis en surbrillance. Cliquer sur « Linear Scale » (échelle linéaire).
12. Cliquer sur « Outlier Removal » (suppression des aberrations) et saisir « 10% » pour le champ « NTC Threshold » (seuil du NTC).
13. Régler le seuil sur 0,05 puis vérifier les valeurs C_T de FAM.

Analyse des données d'évaluation de l'échantillon

Exécuter l'analyse de contrôle

Consulter l'organigramme de la figure 37, page 92 relatif à l'exécution de l'analyse de contrôle.

- **Contrôle négatif** : pour garantir l'absence de contamination du mélange réactionnel, le contrôle négatif ne doit pas générer une valeur C_T inférieure à 40 dans le canal vert. Pour garantir le bon paramétrage de la micro-plaque, le NTC doit afficher une amplification de 31,91 à 35,16 dans le canal jaune. Les valeurs spécifiées comprennent et sont comprises dans ces valeurs.
- **Contrôle positif** : le témoin positif (PC) KRAS doit fournir une valeur C_T comprise entre 23,5 et 29,5 dans le canal vert pour chacun des 8 tests. Les valeurs spécifiées comprennent et sont comprises dans ces valeurs. Une valeur se trouvant en dehors de cette plage indique un problème de configuration du test et l'échec de l'analyse.

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

Sous réserve que les deux contrôles d'analyse soient valides, chaque valeur C_T de l'échantillon doit être comprise entre 21,92 et 32,00 dans le canal vert. Si l'échantillon se trouve en dehors de ces limites, les critères suivants sont utilisés.

Analyse des échantillons – test de contrôle

- **C_T de test témoin de l'échantillon $< 21,92$** : les échantillons présentant un C_T témoin de $< 21,92$ doivent être dilués car il s'agit de la limite inférieure validée du test. 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. Si cette valeur est proche de 21,92, la dilution est recommandée pour garantir l'obtention d'un résultat de cette analyse d'échantillon (détection des mutations KRAS). Les échantillons doivent être dilués en utilisant l'eau fournie dans le kit (eau sans nucléase pour dilution ; [Dil.]).
- **C_T de test témoin de l'échantillon > 32** : il est recommandé d'extraire l'échantillon une nouvelle fois car la quantité d'ADN matrice initiale ne sera pas suffisante pour détecter toutes les mutations aux valeurs seuil indiquées pour le test.

Analyse de la détection des mutations KRAS

Exécuter l'analyse de contrôle

Consulter l'organigramme (figure 37, page 92) relatif à l'exécution de l'analyse de contrôle.

- **Contrôle négatif** : pour garantir l'absence de contamination du mélange réactionnel, le contrôle négatif ne doit pas générer une valeur C_T inférieure à 40 dans le canal vert. Pour garantir le bon paramétrage de la microplaque, le NTC doit afficher une amplification de 31,91 à 35,16 dans le canal jaune. Les valeurs spécifiées comprennent et sont comprises dans ces valeurs.
- **Contrôle positif** : le témoin positif (PC) KRAS doit fournir une valeur C_T comprise entre 23,5 et 29,5 dans le canal vert pour chacun des huit tests. Les valeurs spécifiées comprennent et sont comprises dans ces valeurs. Une valeur se trouvant en dehors de cette plage indique un problème de configuration du test et l'échec de l'analyse.

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

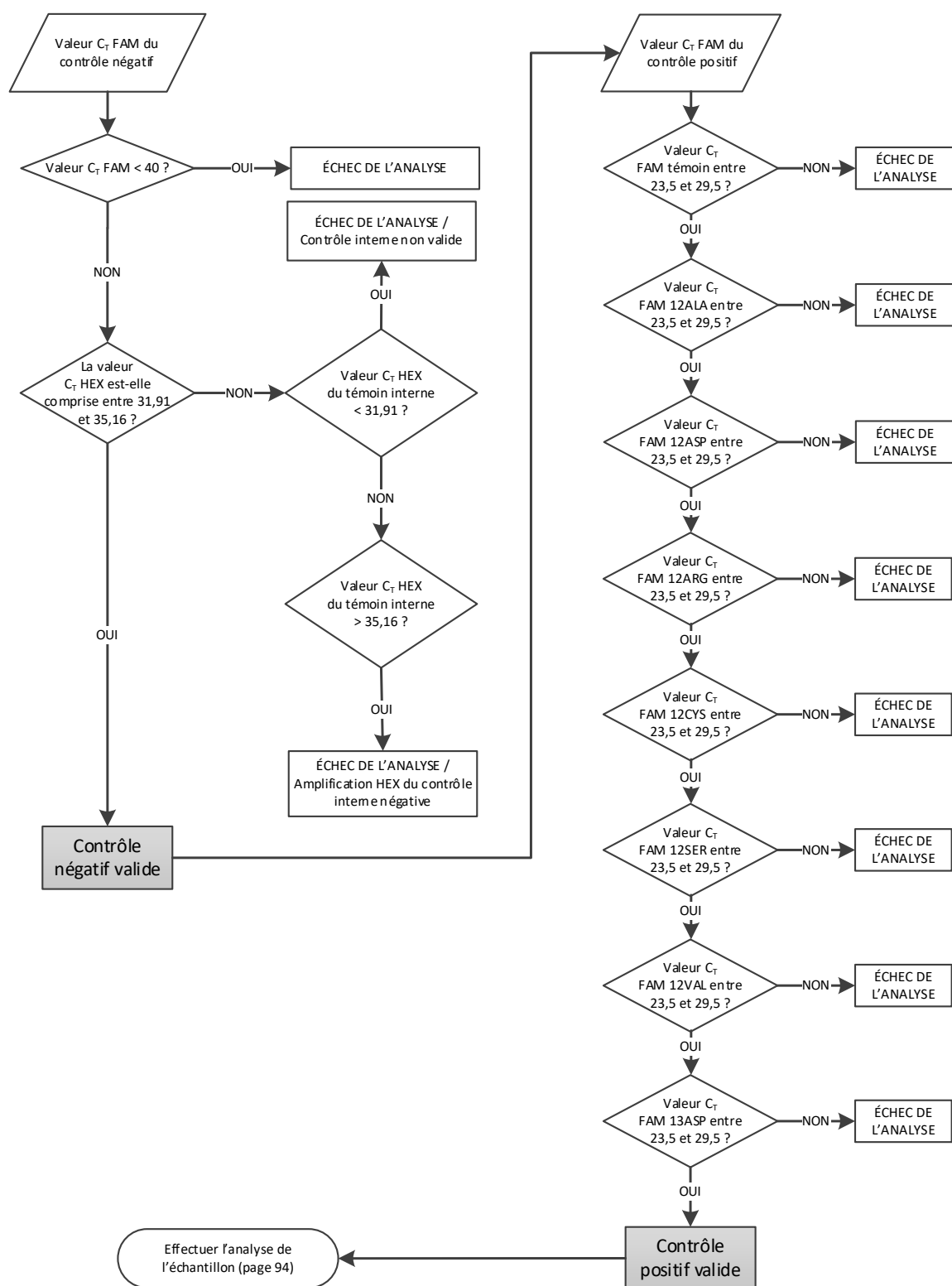


Figure 37. Organigramme relatif à l'exécution de l'analyse de contrôle.

Analyse des échantillons

Consulter l'organigramme de la figure 38, page 94 relatif à l'analyse des échantillons.

Valeur C_T FAM du contrôle de l'échantillon

Sous réserve que les deux contrôles d'analyse soient valides pour le test de contrôle, chaque valeur C_T du contrôle d'échantillon doit être comprise entre 21,92 et 32,00 dans le canal vert.

Si l'échantillon se trouve en dehors de ces limites, les critères suivants sont utilisés.

- **C_T de test de contrôle de l'échantillon < 21,92** : les échantillons avec un C_T de contrôle inférieur à 21,92 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. Les échantillons doivent être dilués en utilisant l'eau fournie dans le kit (eau sans nucléase pour dilution ; [Dil.]).
- **C_T de test de contrôle de l'échantillon > 32** : interpréter ces résultats avec prudence car des mutations de très faible niveau peuvent ne pas être détectées.

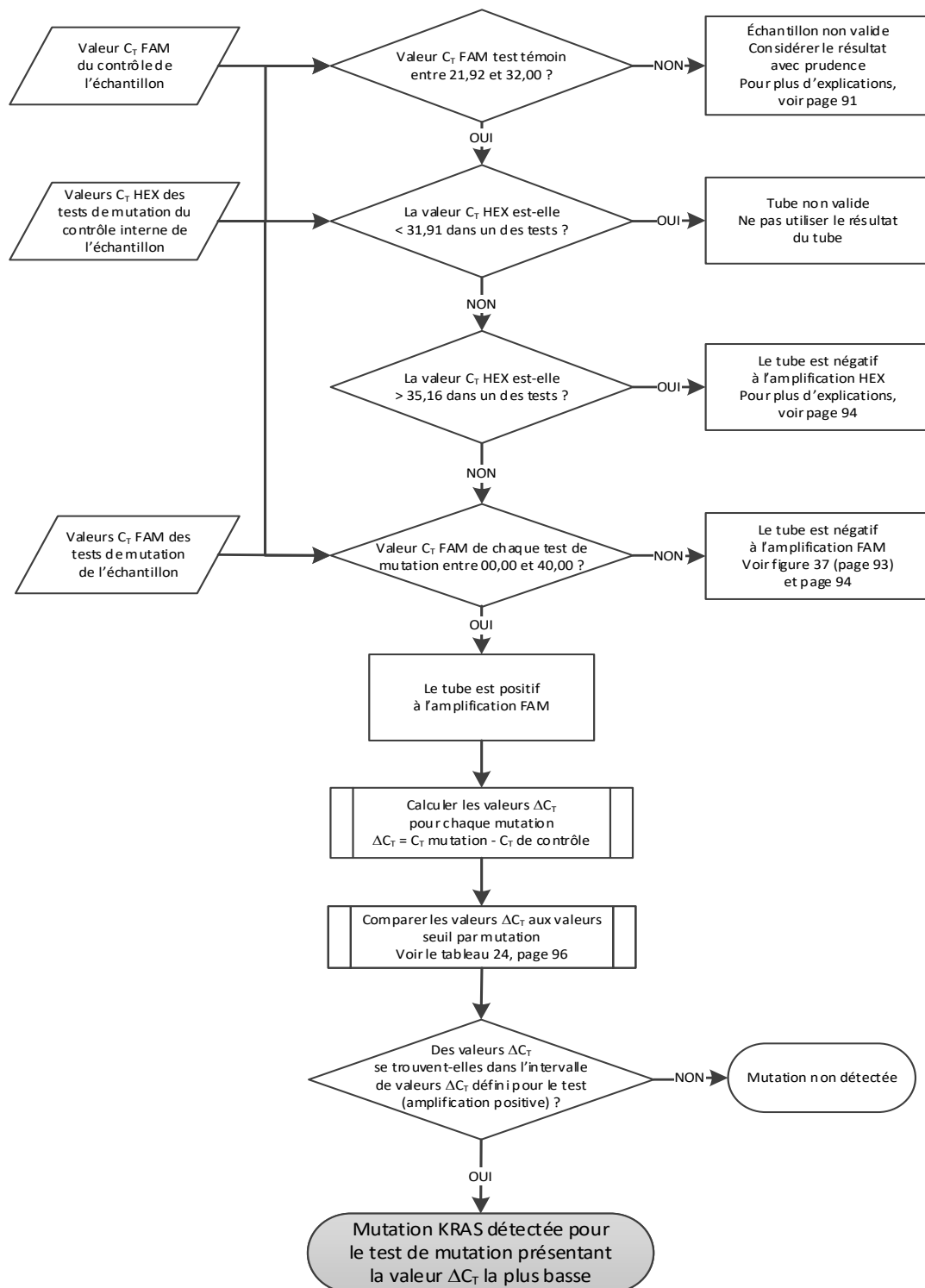


Figure 38. Organigramme relatif à l'analyse des échantillons.

Valeur C_T HEX des tests de mutation du témoin interne de l'échantillon

Consulter l'organigramme de la figure 38, page 94 relatif à l'analyse des échantillons.

Tous les puits de chaque échantillon doivent être analysés. Vérifier que chaque puits génère un signal HEX à partir du contrôle interne. Trois résultats sont possibles.

- Si la valeur C_T du témoin interne est conforme à l'intervalle spécifié (31,91 à 35,16), l'échantillon est positif à l'amplification HEX.
- Si la valeur C_T du témoin interne est supérieure à l'intervalle spécifié (> 35,16), l'échantillon est négatif à l'amplification HEX.
- Si la valeur C_T du témoin interne est inférieure à l'intervalle spécifié (< 31,91), l'échantillon n'est pas valide.

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 noter que l'ADN cible serait alors lui aussi dilué. Un tube d'eau pour dilution de l'échantillon (Dil.) est inclus dans le kit.

Valeur C_T FAM des tests de mutations des échantillons

Les valeurs FAM des 7 mélanges réactionnels doivent être vérifiées par rapport aux valeurs énumérées dans le tableau 24.

Tableau 24. Valeurs de réaction de mutation d'échantillon acceptables (FAM)*

Test	Limites acceptables de C _T	Intervalle ΔC _T
12ALA	0,00-40,00	≤ 8,00
12ASP	0,00-40,00	≤ 6,60
12ARG	0,00-40,00	≤ 8,00
12CYS	0,00-40,00	≤ 8,00
12SER	0,00-40,00	≤ 8,00
12VAL	0,00-40,00	≤ 7,50
13ASP	0,00-40,00	≤ 7,50

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

- Si la valeur C_T FAM est conforme à l'intervalle spécifié, 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 ΔC_T de chaque tube de mutation positif à l'amplification FAM comme suit, tout en s'assurant que les valeurs C_T du test de contrôle et du test de mutation 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 le point seuil du test en question (tableau 24) 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 potentiellement provenir du signal de bruit 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 seuil, elle est classée comme négative ou hors des limites de détection du kit.

Pour chaque échantillon, un état « 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 les valeurs ΔC_T sont inférieures ou égales à la valeur seuil. Si plusieurs mutations sont détectées, la mutation signalée doit être celle présentant la valeur ΔC_T la plus faible.

Mutation non détectée :

- L'amplification FAM positive et les valeurs ΔC_T sont supérieures à la valeur seuil.
- L'amplification FAM est négative et l'amplification HEX (témoin interne) est positive.

Non valide :

- Le HEX (témoin interne) n'est pas valide.
- L'amplification FAM et l'amplification HEX (témoin interne) sont négatives.

Si un échantillon est négatif à l'amplification HEX dans un tube, mais positif à l'amplification FAM dans un autre tube, un résultat « mutation détectée » peut toujours être considéré comme valide dans cet autre tube, mais il se peut que la mutation particulière identifiée ne soit pas fiable.

- Si un échantillon est négatif à l'amplification HEX, mais positif à l'amplification FAM dans le même tube, le résultat « mutation détectée » doit être considéré comme étant valide.
- Si un tube n'est pas valide pour l'amplification HEX (témoin interne), le résultat de ce tube ne doit pas être utilisé.

Attribution de l'état mutationnel de l'échantillon

Une fois tous les tubes de réaction de mutation évalués, l'état de mutation de l'échantillon est déterminé de la manière suivante.

- **Mutation détectée** : au moins une des 7 réactions de mutation est positive. Si plusieurs mutations sont détectées, la mutation signalée doit être celle présentant la valeur ΔC_T la plus faible.
- **Mutation non détectée** : les 7 réactions de mutation sont négatives.
- **Non valide** : aucune réaction de mutation n'est positive et au moins une réaction de mutation n'est pas valide.

Remarque : le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR vise à détecter des mutations dans un gène KRAS d'un échantillon d'ADN. Lorsque des mutations KRAS ont été détectées pour un échantillon, seule une mutation spécifique doit être prise en compte. Si plusieurs mutations sont détectées, la mutation signalée doit être celle présentant la valeur ΔC_T la plus faible.

Des réactivités croisées peuvent survenir entre des réactions de mutation. Par exemple, si un niveau élevé de mutation 12ALA est observé, d'autres réactions de mutation peuvent aussi donner un résultat positif car les amorces ARMS détectent d'autres mutations de séquence similaire. Si le second test de mutation donne un résultat positif, il est possible qu'il s'agisse de réactivité croisée. Bien que ceci soit rare, des doubles mutants ont déjà été observés.

Si une ou plusieurs réactions de mutation ne sont pas valides, mais qu'au moins une est positive, le résultat de l'échantillon peut toujours être considéré comme « mutation KRAS détectée » puisqu'une mutation est bien présente. Toutefois, il se peut que la mutation spécifique signalée ne soit pas précise et qu'elle corresponde à un résultat de réactivité croisée. Par conséquent, le résultat de l'échantillon doit uniquement être considéré comme étant « mutation KRAS détectée ».

Annexe 2 : Installation du logiciel *therascreen* KRAS Assay Package

Le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR est conçu pour une utilisation avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx avec un rotor à 72 puits. Le logiciel *therascreen* KRAS Assay Package est disponible séparément sur CD (n° de réf. 9022641).

Le logiciel *therascreen* KRAS Assay Package est disponible au téléchargement sur la page Web du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR : www.qiagen.com. Les informations de téléchargement se trouvent à la section « Product Resources » (ressources produit) sous l'onglet « Supplementary Protocols » (protocoles additionnels). Les logiciels Assay Package peuvent également être commandés sur un CD.

Il comprend le modèle « *therascreen* KRAS CE QC Locked Template » et le modèle « *therascreen* KRAS CE Locked Template ».

Remarque : le logiciel *therascreen* KRAS Assay Package version 3.1.1 (QIAGEN, n° de réf. 9023675) ne fonctionne qu'avec le logiciel Rotor-Gene Q version 2.3 correspondant. Vérifier que la bonne version du logiciel Rotor-Gene Q est installée avant de poursuivre l'installation du logiciel *therascreen* KRAS Assay Package.

Procédure (téléchargement)

1. Télécharger le logiciel *therascreen* KRAS RGQ Assay Package sur la page Web du kit *therascreen* KRAS RGQ PCR : www.qiagen.com.
2. Ouvrir le fichier zip en double-cliquant dessus et en extrayant le fichier dans l'archive.
3. Démarrer l'installation en double-cliquant sur le fichier extrait « *therascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe* ».

Procédure (CD)

1. Commander le CD CE du logiciel *therascreen* KRAS RGQ Assay Package compatible avec le logiciel Rotor-Gene Q installé (voir ci-dessus), disponible séparément auprès de QIAGEN.
Version 3.1.1. N° réf. 9023675.
2. Insérer le CD dans le lecteur de l'ordinateur portable connecté à l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

3. Démarrer l'installation en double-cliquant sur le fichier **therascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe**
OU
therascreen_KRAS_Assay_Package_1.0.12.exe.
4. L'assistant d'installation s'affiche. Cliquer sur « Next » (suivant) pour continuer (figure 39).

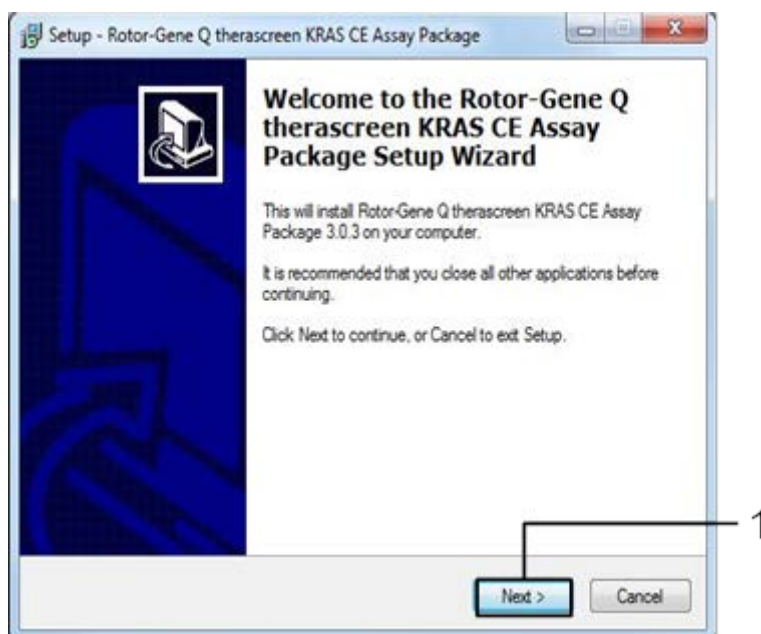


Figure 39. Boîte de dialogue « Setup » (installation). 1 = « Next » (suivant).

5. Lire l'accord de licence dans la boîte de dialogue « License Agreement » et accepter l'accord en cochant la case « I accept the agreement ». Cliquer sur « Next » (suivant) pour continuer (figure 40).

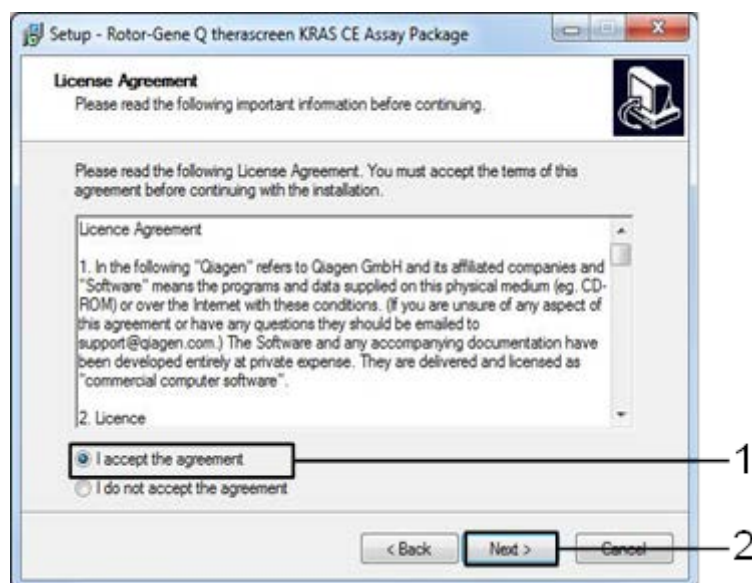


Figure 40. Boîte de dialogue « License Agreement » (accord de licence). 1 = case « I accept the agreement » (j'accepte l'accord), 2 = « Next » (suivant).

6. L'installation par défaut démarre automatiquement et une boîte de dialogue « Setup » (installation) s'affiche à la fin. Cliquer sur « Finish » (terminer) pour quitter l'assistant d'installation (figure 41).

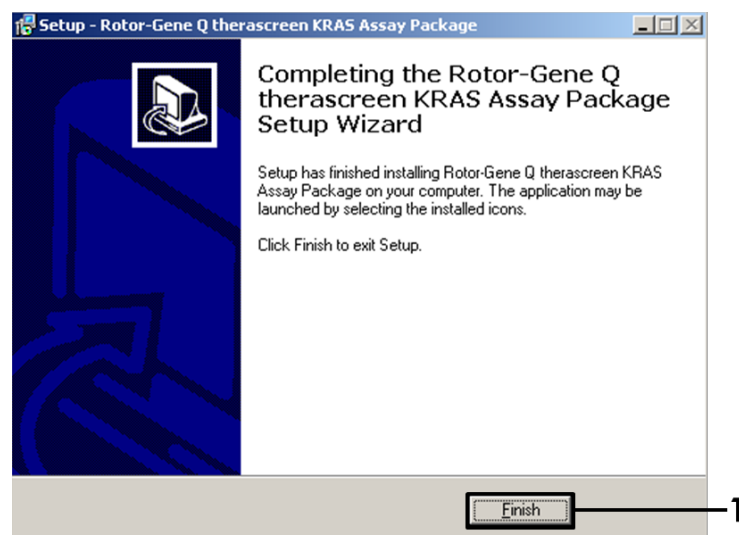


Figure 41. Fin de l'installation.

7. Redémarrer l'ordinateur. Les raccourcis des modèles « therascreen KRAS QC Locked Template » et « therascreen KRAS Locked Template » s'affichent automatiquement sur le bureau.

Pour commander

Produit	Contenu	N° réf.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	Pour 24 réactions : 1 test de contrôle, 7 tests de mutation, contrôle positif, eau, <i>Taq</i> ADN polymérase	874011
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (version 3.1.1)	Package de protocole logiciel destiné à une utilisation avec le kit <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR et l'instrument QIAGEN Rotor-Gene Q MDx avec un rotor à 72 puits	9023675
Rotor-Gene Q et ses accessoires		
Rotor-Gene Q MDx	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	9002032
Rotor-Gene Q MDx	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	9002033
Loading Block 72 × 0.1 ml Tubes	Bloc en aluminium pour préparation de réaction manuelle avec pipette à canal unique dans des tubes de 72 × 0,1 ml	9018901
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 × 250 barrettes de 4 tubes et capuchons pour 10 000 réactions	981106

Produit	Contenu	N° réf.
Kit QIAamp DNA FFPE Tissue – pour la purification d’ADN génomique des tissus inclus en paraffine		56404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pour 50 préparations d’ADN : colonnes QIAamp MinElute®, protéinase K, tampons et tubes de prélèvement (2 ml)	

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de 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

Historique des révisions du document	
R4 01/2019	Ajout du représentant agréé (page de couverture). Section « Symboles » mise à jour. Modèle actualisé.

Marques déposées : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (Groupe QIAGEN) ; ARMS® (AstraZeneca Ltd.) ; FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Les noms déposés, marques déposées etc. utilisés dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement indiqués comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

Ne doit pas être utilisé avec des échantillons de selles.

Ne doit pas être utilisé avec des échantillons d'urine.

Ne doit pas être utilisé avec de l'acide nucléique extracellulaire provenant d'échantillons sanguins.

Ne doit pas être utilisé avec des échantillons de moelle osseuse acellulaire.

Ne doit pas être utilisé avec des échantillons de salive.

L'ACHAT DE CE PRODUIT CONFÈRE À L'ACHETEUR DES DROITS SELON CERTAINS BREVETS ROCHE, POUR UNE UTILISATION RÉSERVÉE AUX SERVICES DE DIAGNOSTIC *IN VITRO* HUMAIN. AUCUN BREVET GÉNÉRAL OU AUCUNE LICENCE DE QUELQUE TYPE QUE CE SOIT, HORMIS LE DROIT SPÉCIFIQUE D'UTILISATION CONFÉRÉ PAR CET ACHAT, N'EST OCTROYÉ PAR LA PRÉSENTE.

Accord de licence limitée pour le kit *therascreen* KRAS RGQ PCR

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

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis 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. 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 sa ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit 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 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 conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

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

HB-1861-004 1116068 01-2019 © 2019 QIAGEN, tous droits réservés.

Pour commander www.qiagen.com/contact | Support technique support.qiagen.com | Site Web
www.qiagen.com

