

Mars 2017

# Manuels des tests AdnaTest OvarianCancerSelect et OvarianCancerDetect



12 (réf. n° 395442)



12 (réf. n° 396442)

Pour l'enrichissement des cellules tumorales du sang total de patients atteints de cancer de l'ovaire et la détection de l'expression de gènes associés au cancer de l'ovaire dans les cellules tumorales enrichies

Pour utilisation en diagnostic in vitro

Version 1



395442 (AdnaTest OvarianCancerSelect)

396442 (AdnaTest OvarianCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE



1106498FR

# Contenu

Utilisation prévue .....	4
Résumé et explication .....	4
Principe de la procédure .....	5
AdnaTest OvarianCancerSelect .....	5
AdnaTest OvarianCancerDetect .....	6
Matériel fourni .....	7
Contenu du kit .....	7
Matériel nécessaire, mais non fourni .....	9
AdnaTest OvarianCancerSelect .....	9
AdnaTest OvarianCancerDetect .....	10
Avertissements et précautions .....	11
Informations de sécurité .....	11
Application .....	11
Brevets .....	11
Stockage et manipulation des réactifs .....	12
Stockage .....	12
Manipulation .....	12
Stockage et manipulation des échantillons .....	13
Préparation des échantillons .....	13
Protocole : Enrichissement de cellules tumorales avec AdnaTest OvarianCancerSelect .....	14
Protocole : Détection de l'expression du gène associé au cancer de l'ovaire dans les cellules tumorales enrichies avec AdnaTest OvarianCancerDetect .....	17

---

Protocole : PCR multiplexe et duplexe.....	22
Interprétation des résultats.....	26
Analyse de fragment sur le système Agilent 2100 Bioanalyzer .....	26
Guide de résolution des principaux problèmes rencontrés .....	31
Contrôle qualité.....	31
Limitations.....	31
Caractéristiques de performance .....	32
Récupération.....	32
Spécificité.....	33
Reproductibilité .....	33
Précision .....	34
Substances interférentes .....	34
Problèmes de santé interférents .....	36
Études cliniques.....	36
Abréviations.....	37
Symboles.....	38
Pour commander .....	39

---

## Utilisation prévue

AdnaTest OvarianCancerSelect est une méthode de diagnostic in vitro conçue pour l'enrichissement immunochimique des cellules tumorales circulantes à partir d'échantillons de sang entier anticoagulé, prélevés sur des patients atteints du cancer de l'ovaire, à travers une combinaison d'antigènes épithéliaux et associés à la tumeur.

AdnaTest OvarianCancerDetect est un test de diagnostic in vitro conçu pour l'analyse des profils d'expression des cellules tumorales par transcription inverse et PCR multiplexe, ainsi qu'une analyse de densitométrie ultérieure des produits amplifiés par PCR à l'aide d'une électrophorèse capillaire automatique avec le système Agilent® 2100 Bioanalyzer.

AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect n'est pas conçu pour le dépistage et ne doit pas être utilisé comme un test de diagnostic servant à confirmer la présence d'un cancer de l'ovaire.

Le produit est destiné à des utilisateurs professionnels, tels que des techniciens et des médecins, formés aux techniques de la biologie moléculaire.

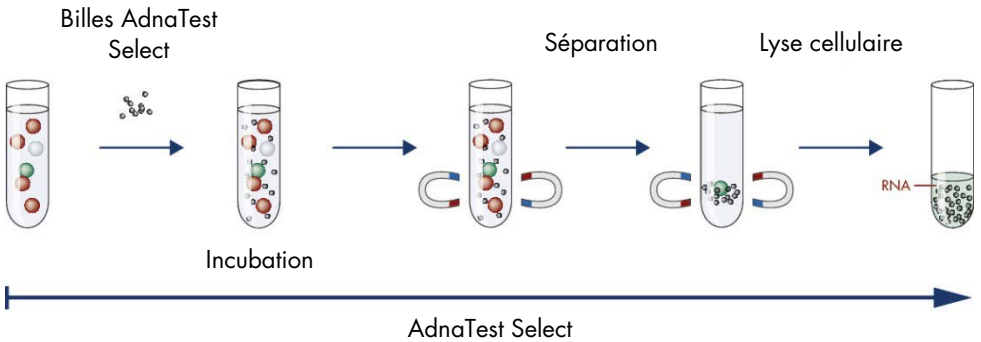
## Résumé et explication

AdnaTest OvarianCancerSelect permet l'enrichissement immunomagnétique de cellules tumorales par le biais d'antigènes épithéliaux et associés à la tumeur. AdnaTest OvarianCancerDetect est conçu pour l'analyse de l'expression de gènes associés au cancer de l'ovaire dans des cellules tumorales soumises à un enrichissement immunomagnétique par transcription inverse et PCR.

# Principe de la procédure

## AdnaTest OvarianCancerSelect

Les anticorps anti-antigènes épithéliaux et associés à la tumeur sont conjugués à des billes magnétiques pour marquer les cellules tumorales dans le sang total. Les cellules marquées sont extraites par un concentrateur de particules magnétiques (AdnaMag-L et AdnaMag-S) avant d'être lysées (Figures 1 et 2).



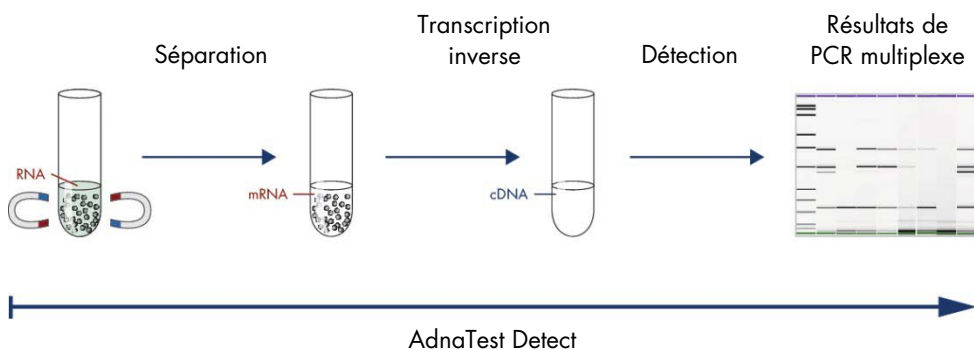
- ○ Cellules sanguines ● Cellules tumorales
- ⊛ Billes magnétiques enrobées d'anticorps ou d'Oligo(dT)25

Figure 1. AdnaTest OvarianCancerSelect : Sélection cellulaire immunomagnétique avec plusieurs anticorps associés à la tumeur.

Le lysat cellulaire est utilisé pour une analyse plus approfondie avec AdnaTest OvarianCancerDetect.

## AdnaTest OvarianCancerDetect

AdnaTest OvarianCancerDetect contient des billes d'Oligo (dT)<sub>25</sub> permettant d'isoler l'ARNm du lysat de cellules tumorales. La transcription inverse produit l'ADNc, qui sert ensuite de matrice pour la détection de cellules tumorales et leur caractérisation par PCR multiplexe/duplexe. AdnaTest PrimerMix OvarianDetect permet d'amplifier trois antigènes associés à la tumeur et un gène contrôle. AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect amplifie le gène ERCC1 (*excision repair cross-complementing 1*) et un gène contrôle.



- Cellules sanguines ● Cellules tumorales
- ⊗ Billes magnétiques enrobées d'anticorps ou d'Oligo(dT)<sub>25</sub>

**Figure 2. AdnaTest OvarianCancerDetect : PCR multiplexe de divers marqueurs tumoraux associés au cancer.** Dans une deuxième étape, les cellules enrichies sont examinées par RT-PCR pour détecter les schémas d'expression associés à la tumeur. Les brins d'ARNm font l'objet d'une transcription inverse en ADNc. Ensuite, plusieurs marqueurs tumoraux associés peuvent être amplifiés avec la PCR multiplexe et visualisés.

Les deux mélanges d'amorces génèrent des fragments des tailles suivantes :

### PrimerMix OvarianDetect

- CA125 : 432 pb
- GA733-2 : 395 pb
- Muc-1 : 299 pb
- Actine : 120 pb (contrôle interne de la PCR)

## PrimerMix ERCC1-Detect

- ERCC1 : 357 pb
- Actine : 120 pb (contrôle interne de la PCR)

**Remarque :** La taille des fragments peut varier légèrement. Veuillez utiliser AdnaTest Positive Control Ovarian et AdnaTest Positive Control ERCC1 pour l'attribution des signaux détectés.

## Matériel fourni

### Contenu du kit

<b>AdnaTest OvarianCancerSelect</b>			
<b>Référence du catalogue</b>			<b>395442</b>
<b>Nombre de tests</b>			<b>12</b>
Tubes de prélèvement	Collection Tubes (Tubes de prélèvement) (15 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 x 5
Tubes de prélèvement	Collection Tubes (Tubes de prélèvement) (1,5 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Rouge	Billes OvarianSelect	OSB	1,2 ml
Rouge	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (Tampon de lyse/liaison)	LBB	2 x 1,2 ml
	Manuel		1

<b>AdnaTest OvarianCancerDetect</b>			
<b>Référence du catalogue</b>			<b>396442</b>
<b>Nombre de tests</b>			<b>12</b>
<b>Réactifs ARN AdnaTest</b>			<b>Boîte 1</b>
Rouge	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (Tampon de lyse/liaison)	LBB	2 ml
Orange	Oligo(dT) <sub>25</sub> Beads (Billes d'Oligo(dT) <sub>25</sub> )	OdT	280 µl
Blanc	RNA Purification Buffer A (Tampon de purification d'ARN A)	BA	4 ml
Blanc	RNA Purification Buffer B (Tampon de purification d'ARN B)	BB	4 ml
Violet	Tris-HCL Buffer (Tampon Tris-HCL)	TB	2 ml
<b>AdnaTest OvarianCancerDetect</b>			<b>Boîte 2</b>
Bleu	AdnaTest PrimerMix OvarianDetect	PMO	144 µl
Orange	AdnaTest Positive Control Ovarian (C+)(Contrôle positif ovaires AdnaTest (C+))	<b>CONTROL +</b>	56 µl
Bleu	AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect	PME	144 µl
Orange	AdnaTest Positive Control ERCC1 (C+) (Contrôle positif ERCC1 AdnaTest (C+))	<b>CONTROL +</b>	56 µl
	Manuel		1

Les réactifs AdnaTest OvarianCancerDetect suffisent pour analyser 6 contrôles PCR et 12 échantillons de sang.



# Matériel nécessaire, mais non fourni

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

## AdnaTest OvarianCancerSelect

### Équipement

- Tube rotator for 15 ml and 1.5 ml tubes (Appareil à tourner les tubes de 15 ml et 1,5 ml) (p. ex. ELMI Ltd., référence IMIX-03)
- Concentrateurs de particules magnétiques
  - AdnaMag-L (référence 399921)
  - AdnaMag-S (référence 399911)

### Matériel

- Tubes AdnaTube (référence 399932), en cas d'utilisation des tubes BD Vacutainer® ACD-A
- Pipettes de 10 ml en verre ou en plastique stériles, exemptes de RNase et pipetteur
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Tubes de réaction de 1,5 ml stériles, exempts de RNase) (par exemple, Sarstedt, référence 72.690)
- Pipettes et pointes de pipettes exemptes de RNase avec filtres anti-aérosols, adaptées pour des volumes de pipetage compris entre 100 µl et 1 000 µl

### Réactifs

- Phosphate buffered saline (PBS) (Solution saline tamponnée au phosphate (PBS)), pH de 7,0 à -7,3 (par exemple Fisher, référence VX14190169, D-PBS)

# AdnaTest OvarianCancerDetect

## Équipement

- Tube rotator for 1.5 ml tubes (Appareil à tourner les tubes de 1,5 ml) (p. ex. ELMi Ltd., référence IMIX-03)
- Magnetic particle concentrator AdnaMag-S (Concentrateur de particules magnétiques AdnaMag-S) (référence 399911)
- Bloc chauffant ou bain-marie (50°C)
- Thermocycleur avec couvercle chauffé et vitesse de chauffage de 2 °C/s.
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

## Matériel

- Tubes PCR de 0,2 ml stériles, paroi fine, exempts de RNase
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Tubes de réaction de 1,5 ml stériles, exempts de RNase) (par exemple, Sarstedt, référence 72.690)
- Pipettes et pointes de pipettes exemptes de RNase avec filtres anti-aérosols, adaptées pour des volumes de pipetage compris entre 1 µl et 200 µl

## Réactifs

- Sensiscript® RT Kit (Kit Sensiscript® RT) (QIAGEN, référence 205211, 50 réactions)
  - **Remarque** : le Sensiscript RT Kit (kit Sensiscript RT) (référence 205211) ne permettra d'analyser que 25 échantillons, car un volume double est nécessaire pour chaque réaction.
- Recombinant RNasin, RNase-inhibitor, 2,500 U (Promega, référence N2511)
- HotStarTaq® Master Mix Kit (Kit HotStarTaq® Master Mix) (QIAGEN, référence 203443, 250 U)
- Glace pilée

---

# Avertissements et précautions

Pour utilisation en diagnostic in vitro

## Informations de sécurité

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

Jeter les échantillons et les tests usagés conformément aux réglementations de sécurité locales.

## Application

Ces tests doivent être réalisés par un personnel qualifié, formé aux techniques de biologie moléculaire.

## Brevets

Des licences de Hoffmann-La Roche AG, Bâle, sont requises pour AdnaTest OvarianCancerDetect. L'achat d'AdnaTest OvarianCancerDetect n'autorise pas l'utilisateur à réaliser la PCR sans licence.

---

# Stockage et manipulation des réactifs

## Stockage

Le système AdnaTest Ovarian est fourni dans trois boîtes. AdnaTest OvarianCancerSelect (référence 395442) et le réactif ARN AdnaTest boîte 1 (boîte 1 de référence 396442) doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration.

AdnaTest OvarianCancerDetect boîte 2 (boîte 2 de référence 396442), contenant plusieurs AdnaTest PrimerMix et plusieurs AdnaTest Positive Control, doit être conservé séparément entre -30 et -15°C. Afin d'éviter toute contamination et les changements répétés de température, aliquoter le primer mix. N'utiliser aucun composant après sa date de péremption.

## Manipulation

- Les billes OvarianSelect contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. L'azide de sodium est cytotoxique et doit, par conséquent, être éliminé avant l'utilisation des billes. (Reportez-vous à « Protocole : Enrichissement de cellules tumorales avec AdnaTest OvarianCancerSelect », page 14 )
- Tous les composants et les réactifs supplémentaires d'autres fournisseurs doivent être conservés conformément aux instructions fournies par ces derniers. Les conseils de sécurité des fabricants respectifs s'appliquent.
- Porter des gants de protection pour éviter toute contamination avec de l'ADN, de l'ARN et des RNases.
- Aliquoter les billes OvarianSelect afin d'éviter toute contamination.
- Le test doit être réalisé dans l'ordre énoncé dans le respect de toutes les spécifications relatives aux temps et températures d'incubation indiquées.

- Jeter les échantillons en cas d'agglutination des billes de sélection lors de l'enrichissement cellulaire.
- Pour éviter toute contamination croisée, réaliser si possible le traitement des échantillons, notamment la transcription inverse et l'analyse ultérieure des produits amplifiés par PCR, dans des pièces différentes.
- L'utilisation de produits de fournisseurs non suggérés est susceptible d'affecter les résultats.
- Respecter les règles de sécurité et d'hygiène du laboratoire (p. ex. porter des blouses de laboratoire, des lunettes de protection et des gants).

## Stockage et manipulation des échantillons

### Préparation des échantillons

- Les échantillons de sang doivent être prélevés avant l'application de substances thérapeutiques. Attendre au moins 7 jours après la dernière intervention thérapeutique avant d'utiliser AdnaTest OvarianCancerSelect !
- Prélèvement sanguin : Si le transport d'échantillons dure moins de 4 heures, utiliser des tubes contenant l'anticoagulant EDTA (p. ex. S Monovette® K3 EDTA, Sarstedt [référence 01.1605.001]) pour prélever au moins 7,5 ml de sang entier.
- Si le transport d'échantillons dure plus de 4 heures, utiliser des tubes BD Vacutainer ACD-A (Becton Dickinson GmbH, référence 366645 [UE] ; 364606 [É-U]) pour prélever au moins 8,5 ml de sang entier. Avant de poursuivre le traitement avec l'AdnaTest, 5 ml de sang ACD-A doivent être transférés dans un tube d'échantillon AdnaTube, référence 399932.
- Le sang doit être conservé immédiatement à une température de 4 °C.
- Les échantillons devraient être traités le plus tôt possible, mais pas plus de 4 heures après le prélèvement sanguin en cas d'utilisation de tubes EDTA standard ou dans les 30 heures suivant le prélèvement en cas d'utilisation de tubes de prélèvement sanguin BD Vacutainer en combinaison avec des tubes AdnaTube.
- L'échantillon de sang ne doit pas être hémolysé.

# Protocole : Enrichissement de cellules tumorales avec AdnaTest OvarianCancerSelect

## Remarques importantes avant de commencer

- Avant de commencer la procédure, lisez « Avertissements et précautions » (page 11), « Stockage et manipulation des réactifs » (page 12) et « Stockage et manipulation des échantillons » (page 13).
- Il est nécessaire d'éliminer l'azide de sodium en lavant les billes OvarianSelect avant de les utiliser, comme décrit ci-dessous dans « Procédure A : Préparation des billes OvarianSelect ».
- Veuillez utiliser les tubes de prélèvement 1,5 ml fournis uniquement pour l'étape du protocole indiquée.

## À effectuer avant de commencer

- Vérifier que le tampon de lyse/liaison AdnaTest a été amené à température ambiante. Si un précipité est observé, laisser le réactif se stabiliser à température ambiante et mélanger jusqu'à ce que le précipité soit complètement dissous.

## Procédure A : Préparation des billes OvarianSelect

1. Remettre les Billes OvarianSelect en suspension soigneusement en pipetant ; ne pas agiter au vortex !
2. Calculer le volume de billes OvarianSelect nécessaire pour tous les échantillons à traiter (100 µl par échantillon) et transférer le volume obtenu dans un tube de réaction de 1,5 ml (non fourni).  
En cas de traitement de plus de 10 échantillons, utiliser d'autres tubes de réaction de 1,5 ml.
3. Placer le tube dans l'AdnaMag-S.
4. Après 1 minute, retirer le surnageant à l'aide d'une pipette.

**Remarque** : Ne pas toucher les billes lors du retrait du surnageant !

## 5. Étapes de lavage :

- 5a. Retirer la glissière magnétique de l'AdnaMag-S.
  - 5b. Ajouter 1 ml de PBS et remettre les billes en suspension en répétant le pipetage.
  - 5c. Placer la glissière magnétique dans l'AdnaMag-S.
  - 5d. Après 1 minute, retirer complètement le surnageant à l'aide d'une pipette.
  - 5e. Répéter les étapes 5a à 5d deux fois (trois lavages au total).
6. Retirer le tube de l'AdnaMag-S et remettre les billes en suspension dans la PBS pour obtenir le volume initial (100 µl par échantillon). Poursuivre avec « Procédure B : Sélection des cellules tumorales », ci-dessous

## Procédure B : Sélection des cellules tumorales

1. En cas d'utilisation de tubes EDTA standard, pipeter 5 ml d'un échantillon de sang dans un tube de prélèvement de 15 ml (fourni).  
En cas d'utilisation de sang ACD-A dans un type ACD-A BD Vacutainer, transférer 5 ml de sang dans un AdnaTube.

**Remarque** : Les tubes AdnaTube sont obligatoires en cas d'utilisation de tubes ACD-A BD Vacutainer.

2. Remettre les Billes OvarianSelect (préparées à l'étape 6 de la procédure A) en suspension soigneusement en pipetant et ajouter 100 µl de ces billes dans chaque échantillon de sang.
3. Faire tourner les tubes lentement (environ 5 tr/min) pendant 30 minutes à température ambiante sur un appareil à la fois inclinable et rotatif.
4. Placer les tubes dans l'AdnaMag-L sans glissière magnétique. Retourner l'AdnaMag-L pour libérer les gouttes de sang capturées dans le bouchon.
5. Insérer la glissière magnétique et incuber les tubes dans l'AdnaMag-L pendant 3 minutes à température ambiante.
6. Retirer complètement le surnageant du sang à l'aide d'une pipette de 10 ml sans toucher les billes.

**Remarque** : Ne pas toucher les billes lors du retrait du surnageant !

## 7. Étapes de lavage :

- 7a. Retirer la glissière magnétique de l'AdnaMag-L.
  - 7b. Ajouter 5 ml de PBS. Fermer les tubes et agiter doucement l'AdnaMag-L d'avant en arrière 5 fois pour remettre les complexes cellules/billes magnétiques en suspension.
  - 7c. Retourner l'AdnaMag-L deux fois pour libérer les gouttes capturées dans le bouchon.
  - 7d. Placer la glissière magnétique dans l'AdnaMag-L et incuber pendant 1 minute à température ambiante.
  - 7e. Retirer complètement le surnageant à l'aide d'une pipette.
  - 7f. Répéter les étapes 7a à 7e deux fois (trois lavages au total).
8. Retirer la glissière magnétique de l'AdnaMag-L.
9. Remettre les complexes cellules/billes magnétiques en suspension dans 1 ml de PBS et transférer chaque échantillon dans un tube de réaction de 1,5 ml (non fourni).
10. Placer les tubes de réaction dans l'AdnaMag-S avec une glissière magnétique.
- Remarque :** La glissière magnétique de l'AdnaMag-S peut être insérée dans deux positions. Toujours insérer la glissière en positionnant le film plastique blanc vers l'avant de sorte que les aimants soient à côté des tubes de réaction.
11. Après 1 minute, retirer complètement le surnageant à l'aide d'une pipette afin d'optimiser la lyse cellulaire suivante.
12. Retirer la glissière magnétique de l'AdnaMag-S.
13. Ajouter 200 µl de tampon de lyse/liaison AdnaTest (stabilisé à température ambiante) dans chaque tube de réaction. Remettre en suspension en pipetant au moins cinq fois.
14. Placer la glissière magnétique dans l'AdnaMag-S et incuber pendant 1 minute.
15. Transférer chaque surnageant (lysats cellulaire) dans un nouveau tube de réaction de 1,5 ml.
16. Jeter les tubes contenant les billes.
17. Poursuivre immédiatement avec l'isolation de l'ARNm (voir « Protocole : Détection de l'expression du gène associé au cancer de l'ovaire dans les cellules tumorales enrichies avec AdnaTest OvarianCancerDetect », page 17) ou conserver les lysats cellulaires à -20 °C pendant 2 semaines au maximum.



---

# Protocole : Détection de l'expression du gène associé au cancer de l'ovaire dans les cellules tumorales enrichies avec AdnaTest OvarianCancerDetect

## Remarques importantes avant de commencer

- Avant de commencer la procédure, lire « Avertissements et précautions » (page 11) et « Stockage et manipulation des réactifs » (page 12).
- Les procédures A à C décrivent l'isolation de l'ARNm et la transcription inverse.
- Veuillez utiliser les tubes de prélèvement 1,5 ml fournis uniquement pour l'étape du protocole indiquée.

## À effectuer avant de commencer

- Vérifier que le tampon de lyse/liaison AdnaTest a été amené à température ambiante. Si un précipité est observé, laisser le réactif se stabiliser à température ambiante et mélanger jusqu'à ce que le précipité soit complètement dissous.
- Porter le tampon de purification d'ARN A et le tampon de purification d'ARN B à température ambiante. Poser le tampon Tris-HCL sur de la glace.
- Décongeler 10 tampons RT et dNTP, du kit Sensiscript RT, à température ambiante. Mélanger par vortexage. Centrifuger brièvement et conserver sur de la glace. Décongeler de l'eau sans RNase (incluse dans le kit Sensiscript RT).
- Régler un bloc chauffant ou un bain-marie sur 50°C.

## Procédure A : Préparation d'Oligo(dT)<sub>25</sub> Beads (Billes d'Oligo(dT)<sub>25</sub>)

1. Remettre les billes d'Oligo(dT)<sub>25</sub> en suspension soigneusement en les pipétant Ne pas les passer à l'agitateur !
2. Calculer le volume de billes nécessaire pour tous les échantillons à traiter (20 µl par échantillon plus 10 %) et transférer le volume obtenu dans un tube de réaction de 1,5 ml exempt de RNase (non fourni).
3. Placer le tube dans l'AdnaMag-S.

**Remarque** : La glissière magnétique de l'AdnaMag-S peut être insérée dans deux positions. Toujours insérer la glissière en positionnant le film plastique blanc vers l'avant de sorte que les aimants soient à côté des tubes de réaction.

4. Après 1 minute, retirer le surnageant à l'aide d'une pipette.
5. Étapes de lavage :
  - 5a. Retirer la glissière magnétique de l'AdnaMag-S.
  - 5b. Ajouter le volume initial (étape 2, page 18) de tampon de lyse/liaison AdnaTest et remettre les billes en suspension par un pipetage répété. Remettre en suspension doucement pour éviter la formation de mousse.
  - 5c. Insérer la glissière magnétique dans l'AdnaMag-S.
  - 5d. Après 1 minute, retirer complètement le surnageant.
  - 5e. Répéter les étapes 5a à 5d une fois (deux lavages au total).
6. Retirer le tube de l'AdnaMag-S et remettre les billes en suspension dans le tampon de lyse/liaison AdnaTest pour obtenir le volume initial (étape 2, page 18). Poursuivre avec « Procédure B : isolation de l'ARNm ».

## Procédure B : isolation de l'ARNm

1. Ajouter 20 µl de billes d'Oligo(dT)<sub>25</sub> (étape 6, ci-dessus) à chaque tube contenant du lysat cellulaire (étape 15, page 16).
2. Faire tourner les tubes lentement (environ 5 tr/min) pendant 10 minutes à température ambiante sur un appareil à la fois inclinable et rotatif.

3. Placer les tubes dans l'AdnaMag-S sans glissière magnétique. Retourner l'AdnaMag-S pour libérer les billes et le liquide capturés dans le bouchon.
4. Insérer la glissière magnétique et retirer le surnageant après 1 minute.
5. Étape de lavage 1 :
  - 5a. Retirer la glissière magnétique de l'AdnaMag-S.
  - 5b. Ajouter 100 µl de tampon de purification d'ARN A dans chaque tube et remettre les billes en suspension avec un pipetage répété. Pour éviter toute perte de billes, rincer soigneusement le couvercle et la paroi des tubes.
  - 5c. Insérer la glissière magnétique dans l'AdnaMag-S.
  - 5d. Après 1 minute, retirer complètement le surnageant.
  - 5e. Répéter les étapes 5a à 5d une fois (deux lavages au total).
6. Étapes de lavage 2
  - 6a. Retirer la glissière magnétique de l'AdnaMag-S.
  - 6b. Ajouter 100 µl de tampon de purification d'ARN B dans chaque tube. Remettre les billes en suspension en pipetant et transférer dans de nouveaux tubes de réaction de 1,5 ml (fournis).
  - 6c. Insérer la glissière magnétique dans l'AdnaMag-S.
  - 6d. Après 1 minute, retirer complètement le surnageant. Cette étape doit être réalisée minutieusement (attention au culot) car des billes pourraient glisser et être retirées par erreur.
  - 6e. Répéter les étapes 6a à 6d une fois dans les mêmes tubes de réaction (deux lavages au total).
7. Retirer la glissière magnétique de l'AdnaMag-S.
8. Ajouter 100 µl de tampon Tris-HCL glacé dans chaque tube et remettre les billes en suspension en pipetant.
9. Insérer la glissière magnétique dans l'AdnaMag-S.
10. Après 1 minute, retirer complètement le surnageant.
11. Retirer la glissière magnétique de l'AdnaMag-S.
12. Remettre le complexe billes/ARNm en suspension dans 29,5 µl d'eau sans RNase.

13. Transférer les tubes dans un bloc chauffant ou un bain-marie et incuber pendant 5 minutes à 50 °C.

14. Placer immédiatement les tubes sur de la glace pendant au moins 2 minutes.

15. Continuer immédiatement (dans les 5 minutes) avec la transcription inverse (Procédure C : Transcription inverse avec le kit Sensiscript RT).

Ne pas conserver le complexe billes/ARNm !

### Procédure C : Transcription inverse avec le kit Sensiscript RT

1. Préparer le RT Master Mix sur de la glace. Pour ce faire, suivre les indications fournies dans le Tableau 1 en fonction du nombre d'échantillons.

Le volume de RT Master Mix devrait être supérieur de 10 % au volume calculé pour le nombre total de réactions de transcription inverse. Une réaction de contrôle négatif sans ajout d'ARNm doit toujours être préparée (contrôle RT).

2. Agiter au vortex le RT Master Mix. Passer brièvement à la centrifugeuse et pipeter 10,5 µl pour chaque réaction dans des tubes PCR de 0,2 ml.

3. Remettre les complexes billes/ARNm (étape 10, page 19) en suspension soigneusement avec une pipette. Transférer le volume total dans le tube de réaction PCR de 0,2 ml contenant le RT Master Mix. Mélanger soigneusement avec un pipetage répété.

**Tableau 1. Configuration de la réaction de transcription inverse**

Composant	Volume
<b>RT Master Mix</b>	
10 × tampons RT	4,0 µl
mélange dNTP (5 mM pour chaque dNTP)	4,0 µl
Inhibiteur de RNase, 40 U/µl (Promega)	0,5 µl
Sensiscript transcriptase inverse	2,0 µl
<b>Matrice d'ARN*</b>	29,5 µl
Complexe mRNA/billes ou eau sans RNase	
<b>Volume total</b>	<b>40,0 µl</b>

\* Comme contrôle RT, ajouter 29,5 µl d'eau sans RNase au lieu du complexe billes/ARNm. Le volume du complexe billes/ARNm peut varier légèrement. Toujours utiliser le volume total de celui-ci dans la réaction de transcription inverse.

4. L'ADNc est synthétisé dans un thermocycleur dans les conditions suivantes (Tableau 2).

**Tableau 2. Programme de transcription inverse**

Étape	Durée	Température
Transcription inverse	60 minutes	37 °C
Dénaturation	5 minutes	93 °C
Refroidissement	∞	4 °C

5. Placer les tubes de réaction contenant l'ADNc sur de la glace ou les conserver à -20 °C pour une durée n'excédant pas 4 semaines.
6. Poursuivez avec « Protocole : PCR multiplexe et duplexe », page 22.

# Protocole : PCR multiplexe et duplexe

## Remarque préliminaire importante

- Avant de commencer la procédure, lire « Avertissements et précautions » (page 11) et « Stockage et manipulation des réactifs » (page 12).

## À effectuer avant de commencer

- Décongeler HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), AdnaTest PrimerMix OvarianDetect, AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect, AdnaTest Positive Control Ovarian, AdnaTest Positive Control ERCC1 et l'eau sans RNase. Passer au vortex, centrifuger brièvement et conserver sur de la glace.

## Procédure A : PCR multiplexe (AdnaTest OvarianDetect)

1. Le Master Mix PCR se prépare conformément aux indications fournies dans le Tableau 3 en fonction du nombre d'échantillons.

Le volume de Master Mix PCR devrait être supérieur d'au moins 10 % au volume nécessaire calculé à partir du nombre d'échantillons. Noter qu'un AdnaTest Positive Control, de l'eau sans RNase comme contrôle négatif et le Contrôle RT doivent toujours être inclus.

2. Pour chaque préparation, déposer 42,0 µl du Master Mix PCR dans des tubes de réaction PCR de 0,2 ml. Remettre le mélange billes/ADNc en suspension en pipetant et en ajouter 8,0 µl dans chaque tube de réaction.

**Remarque** : Comme contrôle négatif, ajouter 8,0 µl d'eau sans RNase au lieu de l'ADNc.

**Tableau 3. Préparation de la PCR multiplexe**

Composant	Volume
<b>Multiplex PCR Master Mix</b>	
HotStarTaq Master Mix	25,0 µl
Eau exempte de RNase	13,0 µl
AdnaTest PrimerMix OvarianDetect	4,0 µl
ADNc ou Contrôle RT ou Contrôle négatif (eau sans RNase) ou AdnaTest Positive Control Ovarian, ajouter :	8,0 µl
<b>Volume total</b>	<b>50,0 µl</b>

3. Un thermocycleur suivant le programme décrit dans le Tableau 4 est utilisé pour la PCR. Utiliser le thermocycleur sur une pente de chauffe de 2 °C/seconde. La PCR est réalisée avec 37 cycles au total.

**Tableau 4. Programme de cycle de PCR**

Étape	Durée	Température
<b>Étape d'activation initiale</b>	15 minutes	95 °C
<b>Cycle en 3-étapes</b>		
Dénaturation	30 secondes	94 °C
Hybridation	30 secondes	58 °C
Extension	30 secondes	72 °C
<b>Extension finale :</b>	10 minutes	72 °C
<b>Refroidissement</b>	∞	12 °C

## Procédure B : PCR duplexe (AdnaTest ERCC1-Detect)

1. Le Master Mix PCR se prépare conformément aux indications fournies dans le Tableau 5 en fonction du nombre d'échantillons.

Le volume de Master Mix devrait être supérieur d'au moins 10% au volume nécessaire calculé à partir du nombre d'échantillons. Noter qu'un AdnaTest Positive Control, de l'eau sans RNase comme contrôle négatif et le Contrôle RT doivent toujours être inclus.

2. Pour chaque préparation, déposer 42,0 µl du Master Mix dans des tubes de réaction PCR de 0,2 ml. Remettre le mélange billes/ADNc en suspension en pipetant et en ajouter 8,0 µl dans chaque tube de réaction.

**Remarque :** Comme contrôle négatif, ajouter 8,0 µl d'eau sans RNase au lieu de l'ADNc.

**Tableau 5. Préparation de la PCR duplexe**

Composant	Volume
Duplex PCR master mix	
HotStarTaq Master Mix	25,0 µl
Eau exempte de RNase	13,0 µl
AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect	4,0 µl
ADNc ou Contrôle RT ou Contrôle négatif (eau sans RNase) ou AdnaTest Positive contrôle ERCC1, ajouter :	8,0 µl
<b>Volume total</b>	<b>50,0 µl</b>



3. Un thermocycleur suivant le programme décrit dans le Tableau 6 est utilisé pour la PCR. Utiliser le thermocycleur sur une pente de chauffe de 2 °C/seconde. La PCR est réalisée avec 35 cycles au total.

**Tableau 6. Programme de cycle de PCR**

Étape	Durée	Température
<b>Étape d'activation initiale</b>	15 minutes	95 °C
<b>Cycle en 3-étapes</b>		
Dénaturation	30 secondes	94 °C
Hybridation	30 secondes	60 °C
Extension	60 secondes	72 °C
<b>Extension finale :</b>	10 minutes	72 °C
<b>Refroidissement</b>	∞	12 °C

# Interprétation des résultats

## Analyse de fragment sur le système Agilent 2100 Bioanalyzer

L'analyse est réalisée avec l'Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) sur un DNA 1000 LabChip®. Suivre les instructions fournies dans le manuel du DNA 1000 LabChip et veiller à ce qu'aucune bille ne soit transférée dans le LabChip. La présence de billes magnétiques dans le gel peut entraîner des résultats erronés.

1. Lancer le logiciel Bioanalyzer « 2100 expert ». Sélectionner « **Instrument** » (instrument) dans « **Contexts** » (contextes), puis cliquer sur le bouton « **Assay** » (dosage) à côté de « **Assay Selection** » (sélection de dosage).
2. Sélectionner « **Electrophoresis** » (électrophorèse) > **DNA 1000 Series II.xsy**. Préparer la puce et lancer l'analyse.
3. Configurer un seuil de détection pour l'évaluation des résultats :
  - 3a. Sélectionner « **Data** » (données) dans « **Contexts** » (contextes), puis cliquez sur l'onglet « **Assay Properties** » (propriétés de dosage). Sélectionner « **Global** » (global) et « **Normal** » (normal) dans le menu déroulant à droite.
  - 3b. Sélectionner « **Sample Setpoints > Integrator > height threshold (FU)** » (Points de consigne des échantillons > Intégrateur > Seuil de hauteur (FU)) et régler cette valeur sur **0** (la valeur par défaut est de **20**) pour détecter tous les signaux.

## Analyse des résultats pour AdnaTest OvarianDetect

Le test est considéré positif si un fragment PCR d'au moins un transcrit associé à la tumeur (GA733-2, Muc-1 ou CA125) est clairement détecté.

Avec l'Agilent 2100 Bioanalyzer, les pics ayant une concentration  $\geq 0.15$  ng/ $\mu$ l sont positifs (Figure 3).

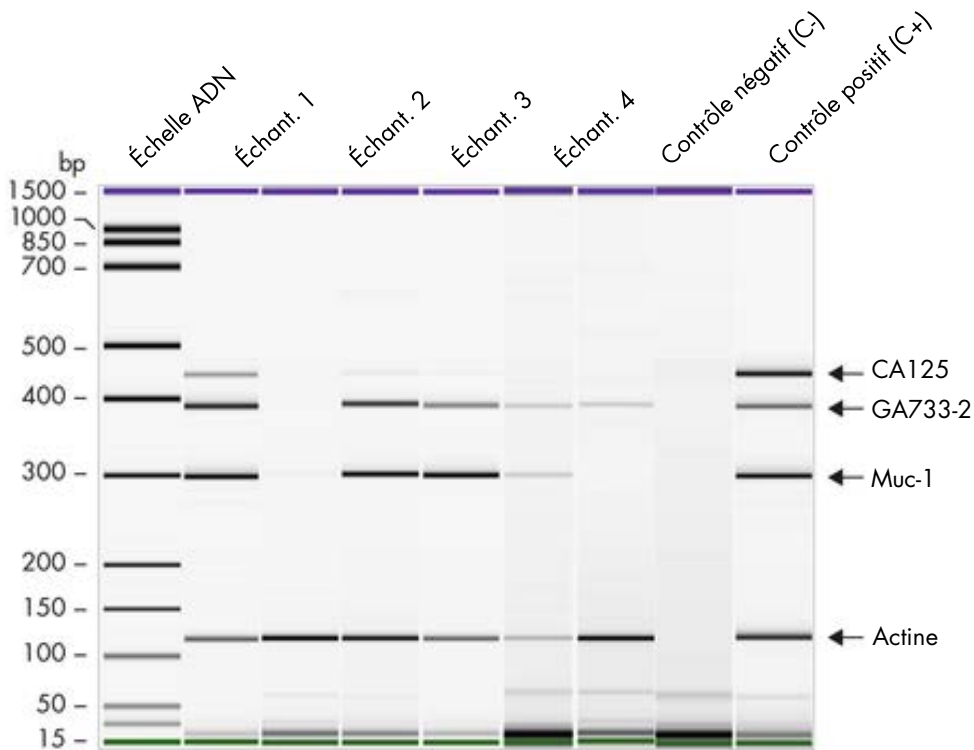
---

Le fragment du gène d'actine de contrôle doit être détecté dans tous les échantillons du test (contrôle PCR interne). Un signal d'actine fournit un contrôle positif pour la réussite de la séparation cellulaire, de la transcription inverse et de la PCR multiplexe. Les échantillons de contrôle négatif et de contrôle RT ne doivent pas être associés à des bandes supérieures à 80 paires de bases (dimères d'amorces).

Un fragment plus grand que 1000 pb indique une contamination avec de l'ADN génomique, suggérant qu'un problème est survenu lors de la séparation cellulaire. Dans ce cas, les résultats ne sont pas valides.

**IMPORTANT : Si le protocole n'est pas respecté avec précision, cela peut donner des résultats faux négatifs ou faux positifs.**

Si vous avez besoin d'aide pour interpréter les résultats, n'hésitez pas à contacter notre équipe de soutien.



**Figure 3. Résultats AdnaTest OvarianCancerDetect d'échantillons PCR multiplexe analysés avec un Agilent 2100 Bioanalyzer.** La première colonne montre la taille d'ADN standard (échelle ADN). L'échantillon 1 est positif pour le GA733-2, le Muc-1 et le CA125 ; les échantillons 3, 4 et 5 sont positifs pour le GA733-2 et le Muc-1 et l'échantillon 6 est positif pour le GA733-2. L'échantillon 2 est négatif. L'actine est détectée dans les échantillons 1 à 6. Le contrôle négatif et le contrôle positif de la PCR apparaissent dans les deux dernières colonnes.

---

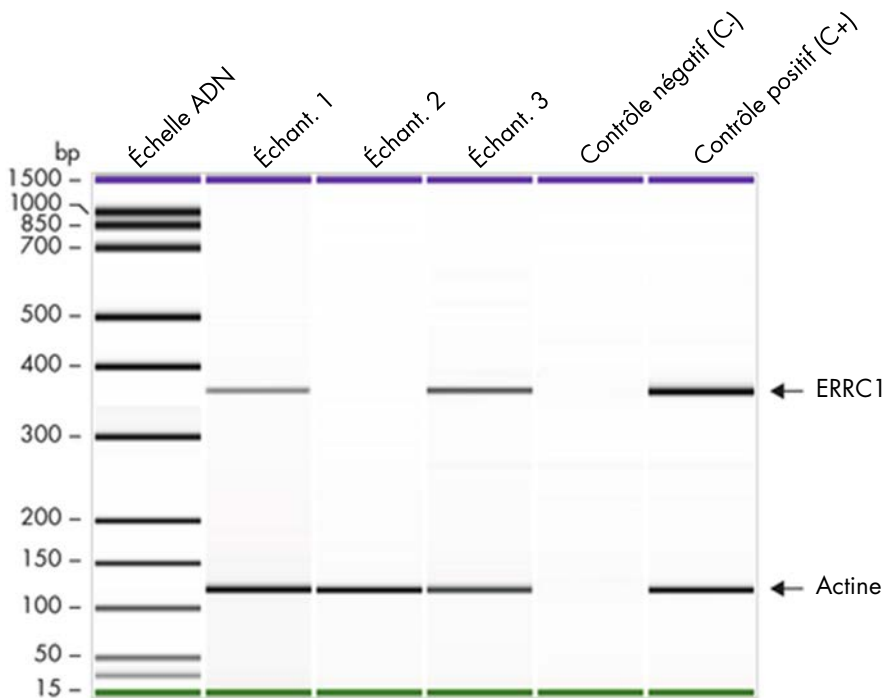
## Analyse des résultats pour AdnaTest ERCC 1-Detect

Avec l'Agilent 2100 Bioanalyzer, les pics ayant une concentration  $\geq 0,2$  ng/ $\mu$ l pour ERCC 1-Detect sont positifs (Figure 4).

Le fragment du gène d'actine de contrôle doit être détecté dans tous les échantillons du test (contrôle PCR interne). Un signal d'actine fournit un contrôle positif pour la réussite de la séparation cellulaire, de la transcription inverse et de la PCR multiplexe. Les échantillons de contrôle négatif et de contrôle RT ne doivent pas être associés à des bandes supérieures à 80 paires de bases (dimères d'amorces).

**IMPORTANT : Si le protocole n'est pas respecté avec précision, cela peut donner des résultats faux négatifs ou faux positifs.**

Si vous avez besoin d'aide pour interpréter les résultats, n'hésitez pas à contacter notre équipe de soutien.



**Figure 4. Résultats AdnaTest OvarianCancerDetect d'échantillons PCR duplexe.** La première colonne montre la taille d'ADN standard (échelle ADN). Les échantillons 1 et 3 sont positifs pour l'ERCC1. L'échantillon 2 est négatif. L'actine est détectée dans les échantillons 1 à 3. Le contrôle négatif de la PCR et le contrôle positif (ERCC1) apparaissent dans les deux dernières colonnes.

---

## Guide de résolution des principaux problèmes rencontrés

Voir la page Foire aux Questions de notre Centre de support technique : [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Les scientifiques des services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations et protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et de dosage (pour les coordonnées, visiter le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot d'AdnaTest OvarianCancerSelect et AdnaTest OvarianCancerDetect est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

## Limitations

Tous les réactifs ne peuvent être utilisés que dans le cadre de diagnostics in vitro.

L'utilisation de ce produit est réservée à un personnel spécialement formé aux procédures de diagnostic in vitro.

L'utilisateur doit impérativement lire attentivement la notice d'instructions avant d'utiliser le système.

Il faut se conformer strictement à la notice d'instructions pour obtenir des résultats de PCR optimaux.

Vérifier les dates de péremption imprimées sur les boîtes et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants au-delà de leur date d'expiration.

Tous les résultats diagnostiques générés doivent être interprétés conjointement à d'autres résultats cliniques ou de laboratoire.

## Caractéristiques de performance

### Récupération

Deux et 5 cellules de cancer de l'ovaire Igrov1 en culture ont été inoculées dans des échantillons de sang de donneurs sains afin de déterminer les taux de récupération obtenus avec l'AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect (Tableau 7).

**Tableau 7. Taux de récupération de cellules tumorales inoculées dans des échantillons de sang de donneurs sains de l'AdnaTest OvarianCancer**

	Nombre total d'échantillons	Nombre de positifs	Récupération
Deux cellules tumorales inoculées dans 5 ml de sang	20	18	90 %
Cinq cellules tumorales inoculées dans 5 ml de sang	20	20	100 %

Le taux de récupération est de 90% % pour la détection de 2 cellules tumorales inoculées dans 5 ml de sang de donneurs sains. Le taux de récupération est de 100 % pour la détection de 5 cellules inoculées dans 5 ml de sang de donneurs sains.



## Spécificité

L'AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect a été utilisé pour analyser 20 donneurs sains afin de déterminer le taux de faux positifs au seuil donné (concentration de fragments de 0,15 ng/µl pour chaque profil génétique inclus, sauf l'actine). Les résultats ont démontré une spécificité de 95 % pour l'AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect (Tableau 8).

**Tableau 8. Détermination des spécifications**

Témoins	Nombre total d'échantillons	Nombre de faux positifs	Spécificité (%)
Donneurs sains	20	1 (5 %)	95

## Reproductibilité

Vingt échantillons de sang de donneurs sains ont été analysés, dans chacun desquels 10 cellules de cancer de l'ovaire Igrov1 avaient été inoculées. Afin de déterminer la reproductibilité du test, ces échantillons sanguins ont été analysés par deux utilisateurs au moyen de l'AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect. La reproductibilité intratest et intertest était de 100 % (Tableau 9).

**Tableau 9. Reproductibilité de l'AdnaTest OvarianCancer Select/Detect**

Utilisateur	Résultat AdnaTest positif/échantillons	Reproductibilité intratest (%)	Reproductibilité intertest (%)
A	10/10	100	100
B	10/10	100	100

## Précision

Afin de déterminer la précision, des aliquots d'ADNc ont été rassemblés en pools et analysés avec l'AdnaTest OvarianCancerDetect. Deux utilisateurs ont analysé 30 échantillons d'ADNc, en réalisant 3 mesures indépendantes de 10 échantillons. La précision intratest et intertest était de 100 % (Tableau 10).

**Tableau 10. Précision de l'AdnaTest OvarianCancerDetect**

Utilisateur	Résultat AdnaTest positif/échantillons	Reproductibilité intratest (%)	Reproductibilité intertest (%)
A	30/30	100	100
B	30/30	100	100

## Substances interférentes

### Anticoagulants

Lors du prélèvement et du transport de sang, l'utilisation d'anticoagulants est obligatoire. Cependant, l'héparine et le citrate entraînent la formation d'agrégats après l'ajout des billes immunomagnétiques de l'AdnaTest, ce qui peut fausser les résultats ou en empêcher l'obtention. Néanmoins, l'EDTA et l'ACDA (solution A de citrate, dextrose et adénine) sont compatibles avec les billes immunomagnétiques de l'AdnaTest.

### Hémolyse

L'hémolyse dans les échantillons de sang (la fraction plasmatique devient rouge) est, dans la plupart des cas, due à de mauvaises conditions de transport ou de conservation. Ces échantillons risquent de donner des faux négatifs et devraient être éliminés.

## Agents chimiothérapeutiques, thérapies ciblées et traitements anti-hormonaux

Les agents chimiothérapeutiques (taxanes, cisplatine, oxaliplatine, 5-FU, anthracycline, irinotécan, etc.) sont de puissantes cytotoxines et entraînent des dommages ou une mort cellulaire rapide dans un échantillon sanguin. Cela se traduit par un risque élevé de faux négatifs lors de l'utilisation des billes immunomagnétiques de l'AdnaTest. Après l'administration de ces substances, le corps humain met environ 5 à 7 jours à les détoxifier (Tableau 11). Les échantillons de sang prélevés lors de cette période ne doivent pas être utilisés avec les billes immunomagnétiques de l'AdnaTest.

**Tableau 11. Demi-vie des agents chimiothérapeutiques**

Médicament	Demi-vie	Référence
5-Fluorouracil	Jusqu'à 20 minutes	<a href="http://www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html">www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html</a>
Docetaxel	Jusqu'à 11,1 heures	<a href="http://www.drugs.com/pro/docetaxel.html">www.drugs.com/pro/docetaxel.html</a>
Cisplatine	Jusqu'à 30 minutes	<a href="http://www.drugs.com/pro/cisplatin.html">www.drugs.com/pro/cisplatin.html</a>
Carbo-platinum	Jusqu'à 5,9 heures	<a href="http://www.drugs.com/pro/carboplatin.html">www.drugs.com/pro/carboplatin.html</a>
Paclitaxel	Environ 25,4 heures	<a href="http://www.drugs.com/pro/paclitaxel.html">www.drugs.com/pro/paclitaxel.html</a>

Les mêmes précautions sont recommandées pour les thérapies ciblées telles que les anticorps (Herceptin®, bévacizumab, cétuximab, etc.), les inhibiteurs des protéines tyrosine kinases (olaparib, Iressa®, Erbitux®, lapatinib etc.) et les traitements anti-hormonaux (tamoxifène, abiratérone, enzalutamide, etc.), administrés seuls ou en association avec des agents chimiothérapeutiques.

Dans les essais cliniques montrant la valeur pronostique des cellules tumorales circulantes identifiées et caractérisées à l'aide des billes immunomagnétiques AdnaTest, aucune interférence négative des agents chimiothérapeutiques, des thérapies ciblées ou des traitements anti-hormonaux n'a été observée lorsqu'une période d'attente d'au moins 7 jours après l'administration du médicament était respectée. En outre, il est peu probable que les médicaments concomitants couramment utilisés (aspirine, ibuprofène, aprépitant, stéroïdes, etc.) aient un impact négatif, mais celui-ci est surveillé.

---

## Problèmes de santé interférents

### Coagulation sanguine

Dans le cadre des essais cliniques, nous avons observé une coagulation sanguine après l'incubation avec des billes immunomagnétiques AdnaTest, le plus souvent dans des échantillons de sang de patients à un stade avancé de la maladie. Les échantillons sanguins qui contiennent des caillots sont difficiles à traiter lors du déroulement de l'AdnaTest en raison de leur plus grande viscosité et ils sont difficiles à pipeter. Ils contiennent également une quantité trop élevée de leucocytes contaminants, ce qui entraîne des faux positifs. Ces échantillons doivent être éliminés.

### Maladie organique bénigne et maladies inflammatoires chroniques

Les maladies organiques bénignes et les maladies inflammatoires chroniques, telles que l'arthrite, l'hyperplasie bénigne de la prostate, la maladie de Crohn, etc., n'entraînent pas de faux positifs à l'AdnaTest.

### Allergie aiguë

En cas d'allergie aiguë, on observe un nombre accru de leucocytes contaminants après l'enrichissement des cellules tumorales circulantes avec les billes immunomagnétiques AdnaTest. Les faux positifs ne peuvent par conséquent pas être totalement exclus.

## Études cliniques

Les résultats d'un essai clinique avec l'AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect ont été publiés dans *Clinical Chemistry* en octobre 2014. Le kit de test du cancer de l'ovaire utilise des billes magnétiques marquées anti-EpCAM et anti-MUC1 pour l'enrichissement des cellules tumorales circulantes, puis une analyse RT-PCR ultérieure de la surexpression d'EpCAM, de MUC1, de CA125 et d'ERCC1. Dans cette étude, les échantillons de sang de 147 patients étaient disponibles au moment du diagnostic primaire. Des cellules tumorales circulantes ont été détectées chez 14 % des patients et ont permis de prédire de manière significative la

survie globale (OS ;  $p=0,041$ ). De plus, les cellules tumorales circulantes ERCC1-positives, trouvées chez 8 % des patients, sont fortement corrélées à une survie sans récurrence (DFS :  $p=0,009$ ) et à une survie globale (OS :  $p=0,026$ ). Surtout, cette étude démontre clairement que les cellules tumorales circulantes ERCC1-positives sont un prédicteur indépendant de résistance aux traitements à base de platine ( $p=0,01$ ). Curieusement, cette corrélation n'a été trouvée que pour la caractérisation moléculaire de cellules tumorales circulantes de l'AdnaTest mais pas pour la coloration de tissus par IHC avec l'anticorps 8F1 communément utilisé pour la détection d'ERCC1 dans les tissus.

## Référence

Kuhlmann, J.D. et al. (2014) ERCC1-Positive Tumor Cells in the Blood of Ovarian Cancer Patients as a Predictive Biomarker for Platinum Resistance. *Clin. Chem.* **60**, 1282–9.

## Abréviations

AdnaMag-L	Concentrateur de particules magnétiques (-grand)
AdnaMag-S	Concentrateur de particules magnétiques (-petit)
pb	Paires de bases
C+	Contrôle positif
C-	Contrôle négatif
CA125	Cancer antigen 125
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADN	Acide désoxyribonucléique
dNTP	Désoxynucléotides triphosphates
ERCC1	Excision repair cross-complementing 1
GA733-2	Antigène 733-2 associé à la tumeur gastro-intestinale
kb	kilobases
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Muc-1	Gène Muc-1
PCR	Polymerase chain reaction (Réaction d'amplification par polymérisation)
RNase	Ribonucléase
tr/min	Tours par minute
RT	Transcription inverse

# Symboles



Contient des réactifs pour <N> tests



À utiliser avant



Limite de température



Référence du catalogue



Lire les informations dans le manuel



Fabricant



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Numéro de matériel



Code article international (GTIN)

# Pour commander

Produit	Contenu	N° réf.
AdnaTest OvarianCancerSelect	Pour l'isolation des cellules tumorales circulantes et l'extraction consécutive de l'ARNm du sang entier humain pour 12 préparations	395442
AdnaTest OvarianCancerDetect	Kit RT-PCR pour la détection de l'expression génétique associée au cancer de l'ovaire dans des cellules tumorales enrichies	396442
<b>Produits connexes</b>		
AdnaTube	12 tubes d'échantillons contenant de l'EDTA. Utiliser uniquement avec du sang anticoagulé dans des tubes de prélèvement sanguin A-CDA de BD	399932
AdnaMag-L	Pour 8 tubes, 15 ml	399921
AdnaMag-S	Pour 8 tubes, 1,5 ml	399911
Sensiscript RT Kit (50)	Pour 50 réactions de transcription inverse :* Sensiscript transcriptase inverse, 150 µl 10x tampon RT, 100 µl mélange dNTP (contient 5 mM chacun de dNTP), 1,1 ml d'eau sans RNase	205211
HotStarTaq Master Mix Kit (250 U)	3 x 0,85 ml HotStarTaq Master Mix (contient 250 unités HotStarTaq ADN polymérase, tampon PCR avec 3 mM MgCl <sub>2</sub> et 400 µM de chacun dNTP) et 2 x 1,7 ml d'eau sans RNase	203443

\* Le kit Sensiscript RT (50) ne permettra d'analyser que 25 échantillons avec AdnaTest OvarianCancerDetect, car un volume double est nécessaire pour chaque réaction.

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.

**Accord de licence limité pour AdnaTest OvarianCancerSelect et AdnaTest OvarianCancerDetect**

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du produit consent aux termes suivants :

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, ce manuel et d'autres protocoles disponibles à l'adresse **www.qiagen.com**. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses 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 termes précédents. 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**.

Marques déposées: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, Sensiscript® (groupe QIAGEN) ; Agilent® (Agilent Technologies, Inc.) ; ERBITUX® (ImClone LLC., une filiale en propriété exclusive d'ElI Lilly and Company) ; Herceptin® (Genentech, Inc.) ; IRESSA® (groupe AstraZeneca) LabChip® (Caliper Life Sciences, Inc.) ; Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.) ; Vacutainer® (Becton Dickinson and Company).

HB-2344-001 © 2017 QIAGEN, tous droits réservés.



---

Pour commander [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Support technique [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Site Web [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)