

Juillet 2023

QIAsure™ Methylation Test

Mode d'emploi (manuel)



Version 1

Pour utilisation avec l'appareil Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM



616014

Self-screen B.V., Plesmanlaan 125, 1066 CX Amsterdam, Pays-Bas

1132288FR

Table des matières

Utilisation prévue	4
Résumé et explication	5
Principe de la procédure	5
Matériel fourni	7
Contenu du kit	7
Matériel nécessaire, mais non fourni	7
Avertissements et précautions	10
Informations de sécurité	10
Précautions générales	10
Précautions relatives aux profils AssayManager	12
Conservation et manipulation des réactifs	13
Manipulation et stockage des prélèvements	14
Préparation des échantillons pour les échantillons conservés dans un milieu PreservCyt	16
Préparation des échantillons pour les échantillons conservés dans un milieu SurePath™	19
Recommandations générales pour la conversion au bisulfite	20
Protocole : QIAsure Methylation Test dans l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	21
Interprétation des résultats	34
Guide de résolution de problèmes	38
Limitations	40
Caractéristiques de performances	42
Limite de détection (LOD)	42
Linéarité	42

Précision	42
Substances interférentes	43
Performances cliniques	44
Fiabilité	47
Références	50
Symboles	52
Coordinées	53
Informations pour commander	54
Historique des révisions du document	57

Utilisation prévue

Le QIAsure Methylation Test (N° de réf. 616014) est un dosage de real-time PCR multiplex spécifique de la méthylation pour la détection de l'hyperméthylation de promoteur des gènes *FAM19A4* et *hsa-mir124-2*. Les échantillons pouvant être testés avec le QIAsure Methylation Test incluent l'ADN converti au bisulfite obtenu à partir des prélèvements suivants :

- Les échantillons cervicaux effectués (par un médecin) avec le *digene*® HC2 DNA Collection Device
- Les échantillons cervicaux effectués (par un médecin) à l'aide d'un dispositif de prélèvement de type brosse ou balai et placés en PreservCyt® Solution ou SurePath™ Solution.
- Les prélèvements vaginaux effectués à l'aide d'un dispositif de type brosse ou balai (autoprélèvements)

Indications d'utilisation :

1. Comme test de suivi pour les patientes positives au test du papillomavirus humain (Human Papillomavirus, HPV), afin de déterminer la nécessité d'une colposcopie ou d'autres procédures de suivi.
2. Comme test de suivi pour les patientes dont le frottis cervico-utérin a montré la présence d'anomalies des cellules malpighiennes atypiques, c'est-à-dire atypies des cellules malpighiennes de signification indéterminée (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US), afin de déterminer la nécessité d'une colposcopie ou d'autres procédures de suivi.

Ce produit est destiné à l'usage des professionnels tels que les techniciens ou les laborantins formés aux procédures de diagnostic in vitro, aux techniques de biologie moléculaire et au système Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

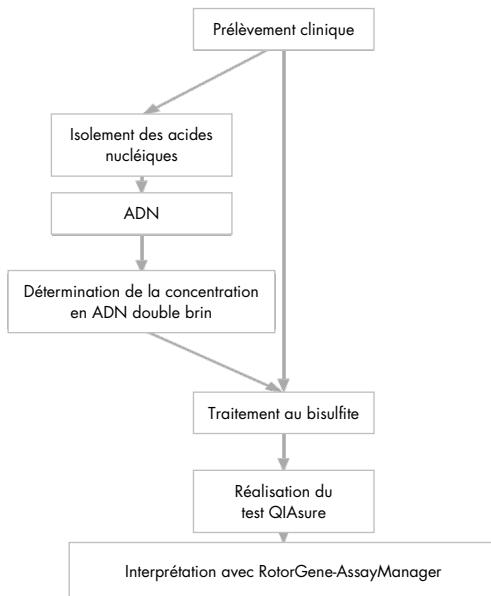
Résumé et explication

La méthylation de l'ADN est un processus biochimique important pour le développement normal des organismes supérieurs (1). Il implique l'addition d'un groupe méthyle à la 5^e position du cycle pyrimidine des nucléotides à cytosine. Les profils de méthylation de l'ADN aberrants jouent un rôle important dans la cancérogenèse. Dans plusieurs cancers et lignées cellulaires cancéreuses chez l'homme, notamment dans le cancer du col de l'utérus et le cancer de l'endomètre, l'hyperméthylation de promoteur des gènes *FAM19A4* (Family with sequence similarity 19 [chemokine (C-C motif)-like]member A4) et/ou *hsa-mir124-2* (*homo sapiens micro RNA 124-2*) a été détectée (2–6). L'analyse de la méthylation du promoteur de la cellule hôte détecte spécifiquement les cancers et lésions des néoplasies intraépithéliales cervicales (CIN) dites « avancées », qui présentent un profil de méthylation de type cancer et un risque élevé à court terme d'évolution vers un cancer (3, 7, 8, 10, 11, 12, 14). Le dosage QIAsure permet la détection de l'hyperméthylation de promoteur des gènes *FAM19A4* et *hsa-mir124-2* dans de l'ADN converti au bisulfite isolé à partir de prélèvements cervicaux ou vaginaux et utilise le gène de l'actine β (ACTB) humaine comme contrôle interne de la qualité des échantillons.

Principe de la procédure

Le QIAsure Methylation Test est un test de real-time PCR multiplex qui amplifie les régions méthylées du promoteur des gènes suppresseurs de tumeur *FAM19A4* et *hsa-mir124-2*, ainsi qu'un fragment d'un gène de référence non spécifique de la méthylation. Le kit contient 2 tubes de QIAsure Master Mix et 2 tubes de QIAsure Calibrator. Le Master Mix est conçu pour l'amplification de l'ADN converti au bisulfite préparé à partir de prélèvements cliniques. Le Master Mix contient les amorces et les sondes pour les gènes cibles et le gène de référence, qui sert de contrôle interne de la qualité des échantillons. Le calibrateur est un plasmide linéarisé contenant les séquences des amplicons de *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* et ACTB.

Étapes de la procédure



Le dosage QIAxure s'effectue sur l'appareil Rotor-Gene Q MDx et le logiciel Rotor-Gene AssayManager® réalise automatiquement le traitement et l'interprétation des données. La valeur de C_T (cycle seuil) représente le nombre de cycles de PCR nécessaires pour la détection d'un signal de fluorescence au-dessus du bruit de fond, ce qui est lié au nombre de molécules cibles présentes dans l'échantillon. Le dosage QIAxure détermine la valeur de ΔC_T en calculant la différence entre la valeur de C_T du gène cible *FAM19A4* ou *hsa-mir124-2* et la valeur de C_T du gène de référence (*ACTB*). Cette valeur de ΔC_T est une valeur quantitative relative pour le niveau de méthylation du promoteur des gènes *FAM19A4* ou *hsa-mir124-2*. Pour la normalisation, la valeur de ΔC_T d'un échantillon de calibrateur est soustraite du ΔC_T du gène cible *FAM19A4* ou *hsa-mir124-2*, ce qui permet d'obtenir la valeur de $\Delta\Delta C_T$ (9). Le calibrateur est un échantillon avec un faible nombre de copies d'ADN plasmidique normalisé qui contient un nombre de copies connu des trois cibles (c.-à-d. *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* et *ACTB*).

Matériel fourni

Contenu du kit

QIAware Methylation Test		72
N° de référence		616014
Nombre de réactions		72
QIAware Master Mix (2 tubes)	Tube de couleur brune	630 µl
QIAware Calibrator (2 tubes)	Tube de couleur transparente	25 µl
Mode d'emploi du QIAware Methylation Test (manuel)		1

Matériel nécessaire, mais non fourni

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

Consommables et réactifs pour la préparation des échantillons obtenus à partir d'autoprélèvements

- Hologic PreservCyt® Solution (Hologic)

Réactifs pour la préparation des échantillons conservés dans le milieu de prélèvement SurePath.

- Buffer AL (numéro de référence QIAGEN : 19075)

Consommables et réactifs pour la conversion au bisulfite

Les kits de conversion au bisulfite compatibles incluent :

- EZ DNA Methylation Kit (ZYMO Research, N° de réf. D5001 ou N° de réf. D5002)
- EZ DNA Methylation-Lighting (ZYMO Research, N° de réf. D5030 ou N° de réf. D5031)
- EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, N° de réf. 59720)
- QIAAsymphony Bisulfite Kit (QIAGEN, N° de réf. 931106)

Consommables pour l'instrument Rotor-Gene Q MDx

- Tubes en barrettes avec bouchon, 0,1 ml (N° de réf. 981103)
- Eau purifiée (p. ex. eau de qualité biologie moléculaire, distillée ou déionisée)

Équipement

- Pipettes réglables* réservées à la PCR (1 à 10 µl ; 10 à 100 µl)
- Gants jetables
- Centrifugeuse de paillasse* avec une vitesse > 10 000 rpm
- Agitateur Vortex*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, N° de réf. Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, N° de réf. ND-3300) ou l'équivalent
- QIAAsymphony SP System (N° de réf. 9001297) pour une extraction automatisée et/ou conversion au bisulfite facultatives

* Vérifier que les appareils ont été contrôlés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

Équipement pour real-time PCR

- Système Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (N° de réf. 9002033) ou appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (N° de réf. 9002032)*
- Logiciel Rotor-Gene AssayManager Core Application version 1.0.x (avec x supérieur ou égal à 4)
- Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in installé, version 1.0.x (avec x supérieur ou égal à 1)
- QIAware Assay Profile (à partir du fichier AP_QIAware_CervicalScrape_V1_0_Y.iap, avec Y égal ou supérieur à 1) pour l'application sur l'ADN converti au bisulfite obtenu à partir d'échantillons cervicaux effectués par un médecin
- Profil du dosage QIAware pour échantillon auto-prélevé par cytobrosse (à partir du fichier AP_QIAware_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap, avec Y égal ou supérieur à 0) pour l'application sur l'ADN converti au bisulfite obtenu à partir d'échantillons vaginaux auto-prélevés par cytobrosse

* Appareil Rotor-Gene Q 5plex HRM avec janvier 2010 ou une date ultérieure comme date de production. La date de production peut être obtenue à partir du numéro de série à l'arrière de l'instrument. Le numéro de série est affiché au format « mmaannn » où « mm » correspond au mois de production en chiffres, « aa » correspond aux deux derniers chiffres de l'année de production et « nnn » est l'identifiant unique de l'appareil.

Avertissements et précautions

Pour utilisation diagnostique in vitro uniquement.

Informations de sécurité

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

QIASURE MASTER MIX



Contient : du 1,2,4-triazole : Danger ! Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

Précautions générales

L'utilisation des tests de PCR nécessite de bonnes pratiques de laboratoire, incluant la maintenance de l'équipement, spécifiques à la biologie moléculaire et en accord avec les réglementations applicables et les normes pertinentes.

Toujours faire attention aux éléments suivants :

- Porter des gants de protection jetables non poudrés, une blouse de laboratoire et une protection oculaire lors de la manipulation des spécimens.

- Éviter toute contamination du prélèvement et du kit par les agents microbiens et les nucléases (DNase). La DNase peut entraîner la dégradation du modèle d'ADN.
- Éviter le transfert de contamination de l'ADN ou du produit de PCR, qui pourrait donner un signal faux positif.
- Utiliser systématiquement des pointes de pipette jetables exempts de DNase munis de barrières à aérosol.
- Les réactifs du dosage QIAware sont dilués de façon optimale. Ne pas effectuer de dilution supplémentaire des réactifs, car cela pourrait compromettre les performances.
- Tous les réactifs fournis dans le kit QIAware sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans le même kit. Ne pas interchanger les réactifs d'un kit avec les mêmes réactifs d'un autre kit QIAware, même du même lot, car cela risquerait d'en affecter les performances.
- Consulter le manuel d'utilisation de l'instrument Rotor-Gene Q MDx pour plus d'informations sur les avertissements, précautions et procédures.
- Avant de lancer la première analyse de la journée, préchauffer le Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM à 95 °C pendant 10 minutes.
- La modification des temps et des températures d'incubation peut entraîner l'obtention de données erronées ou discordantes.
- Ne pas utiliser les composants du kit ayant dépassé la date d'expiration ou conservés de manière inappropriée.
- Réduire au minimum l'exposition des composants à la lumière, car elle peut affecter les mélanges réactionnels.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination des mélanges avec les substances synthétiques contenues dans les réactifs PCR.
- Jeter les échantillons et les dosages usagés conformément aux procédures de sécurité locales.

Précautions relatives aux profils AssayManager

Différents profils AssayManager sont requis en fonction des types d'échantillons. Vérifier que le profil d'essai correct est utilisé pour chaque type d'échantillon, comme indiqué ci-dessous :

- Le profil du dosage « QIAware pour frottis cervicaux » (à partir du fichier AP_QIAware_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) doit être utilisé pour les tests d'ADN converti au bisulfite obtenu à partir d'échantillons cervicaux effectués par un médecin
- Le profil du dosage « QIAware pour les échantillons auto-prélevés par cytobrosse » (à partir du fichier AP_QIAware_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) doit être utilisé pour les tests d'ADN converti au bisulfite obtenu à partir d'échantillons vaginaux auto-prélevés par cytobrosse

Conservation et manipulation des réactifs

Conditions d'expédition

Le QIASure Methylation Test est expédié sur carboglace. Si l'un des composants du QIASure Methylation Test arrive non congelé, si l'emballage extérieur a été ouvert au cours du transport ou si le colis ne contient pas la notice d'emballage, les manuels ou les réactifs, contacter l'un des services d'assistance technique ou l'un des distributeurs locaux de QIAGEN (voir la quatrième de couverture ou consulter le site www.qiagen.com).

Conditions de conservation

Le QIASure Methylation Test doit être stocké dès leur livraison entre -30 et -15 °C dans un congélateur à température constante et protégé de la lumière.

Stabilité

Lorsqu'il est stocké dans les conditions de conservation spécifiées, le QIASure Methylation Test est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la boîte.

Une fois ouverts, les réactifs peuvent être conservés dans leur emballage d'origine à une température comprise entre -30 et -15 °C. Éviter les cycles congélation/décongélation. Ne pas dépasser un maximum de 3 cycles de congélation/décongélation.

- Mélanger doucement le tube en le retournant 10 fois et centrifuger tous les tubes avant ouverture.
- Les dates d'expiration de chaque réactif sont mentionnées sur les étiquettes individuelles de chaque composant. Dans des conditions correctes de conservation, le produit conservera ses performances pendant la période de stabilité, pourvu que les mêmes lots de composants soient utilisés.

Manipulation et stockage des prélèvements

ATTENTION



Tous les prélèvements doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Échantillons cervicaux

Le kit QIAware est conçu pour une utilisation avec des échantillons d'ADN génomique traité au bisulfite obtenu à partir d'échantillons cervicaux. Les milieux de collecte validés pour les échantillons cervicaux (frottis) sont le milieu de prélèvement PreservCyt®, le milieu de prélèvement SurePath™ et le milieu de transport des échantillons *Digene Specimen Transport Medium*. La température optimale de stockage des échantillons cliniques est entre 2 et 8 °C à l'arrivée au laboratoire. Dans ces conditions de stockage, les échantillons dans le milieu de prélèvement PreservCyt ou SurePath™ sont stables pendant 3 mois avant l'extraction d'ADN.

Remarque : les échantillons cervicaux dans le STM doivent être expédiés à 2–30 °C pour une livraison sous 24 heures au laboratoire où sont effectués les tests et ils doivent être recongelés à -20 °C dès leur réception.

Échantillons vaginaux auto-prélevés par cytobrosse

Le QIAware Methylation Test est conçu pour une utilisation avec des échantillons d'ADN génomique traité au bisulfite obtenu à partir d'échantillons vaginaux auto-prélevés par cytobrosse. Les échantillons auto-prélevés par cytobrosse peuvent être prélevés et expédiés secs, puis stockés dans du milieu de prélèvement PreservCyt avec un volume de stockage de 2 à 3 mL. Les échantillons dans le milieu de prélèvement PreservCyt peuvent être stockés entre 2 et 8 °C ou à température ambiante pendant un maximum de 3 mois.

Échantillons d'ADN génomique

Une fois l'ADN génomique extrait, les échantillons d'ADN peuvent être stockés et expédiés entre -30 °C et -15 °C pendant un maximum de 12 mois.

Préparation des échantillons pour les échantillons conservés dans un milieu PreservCyt

Le QIAsure Methylation Test a été validé pour une utilisation avec de l'ADN génomique traité au bisulfite obtenu à partir d'échantillons cervicaux. Une conversion au bisulfite de l'ADN génomique peut être exécutée :

- i) après l'extraction de l'échantillon et le contrôle de la qualité de l'ADN, ou
- ii) directement sur l'échantillon cervical avec l'EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, N° de réf. 59720), ou
- iii) directement sur l'échantillon cervical avec le QIASymphony Bisulfite Kit (QIAGEN N° de réf. 931106).

Notre recommandation est décrite ci-dessous.

- i) Conversion au bisulfite après l'extraction et le contrôle de la qualité de l'ADN
Ce protocole requiert l'extraction d'ADN, la mesure de la concentration en ADN, puis l'aliquotage du volume d'éluat optimal avant le début du protocole de conversion au bisulfite. Il a été vérifié pour l'EZ DNA Methylation™ Kit (N° de réf. D5001) et l'EZ DNA Methylation-Lightning Kit (N° de réf. D5030) de ZYMO Research. Nous recommandons les méthodes suivantes :
 - Extraction d'ADN
Les kits d'extraction d'ADN classiques (p. ex. les kits faisant appel à des colonnes ou à des billes magnétiques) sont compatibles avec le QIAsure Methylation Test.
 - Mesure de la concentration en ADN
Avant la conversion au bisulfite de l'ADN, mesurer la concentration en ADN. Les systèmes adaptés à la mesure des concentrations en ADN sont le Qubit® Fluorometer, le NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (fabriqués tous deux par Thermo Fisher Scientific) ou les systèmes équivalents.

- Aliquotage de l'éluat d'ADN

La quantité d'ADN optimale pour la conversion au bisulfite est comprise entre 100 ng et 2 µg, une quantité de 200 ng étant recommandée pour la conversion au bisulfite. Si la concentration en ADN est trop faible pour la conversion au bisulfite, répéter l'extraction d'ADN avec un plus grand volume d'échantillon clinique ou éluer l'ADN dans un plus petit volume d'élution.

- La conversion au bisulfite avec l'EZ DNA Methylation Kit et l'EZ DNA Methylation-Lightning Kit doit s'effectuer conformément aux recommandations du fabricant.

Remarque : d'après l'EZ DNA Methylation Kit, la quantité maximale d'ADN de l'échantillon ne doit pas dépasser 2 µg pour que l'efficacité du traitement au bisulfite soit suffisante (> 98 %).

- ii) Conversion au bisulfite directement sur un échantillon cervical avec l'EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit

La conversion au bisulfite effectuée directement sur échantillon cervical collecté dans PreservCyt® Solution a été vérifiée pour l'EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit de QIAGEN. Consulter le *manuel d'EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion* pour le traitement des échantillons d'ADN fortement concentrés (1 ng–2 µg) conformément aux recommandations du fabricant, à l'exception des éléments suivants :

- 1^{re} étape du protocole. Prendre 2,5 % d'échantillon cervical dans le milieu de prélèvement PreservCyt® (c.-à-d. 500 µl à partir d'un volume de 20 ml) et culotter l'échantillon par centrifugation pendant 10 minutes à au moins 3 390 x g. Jeter le surnageant en laissant un maximum de 20 µl de milieu de prélèvement PreservCyt avec le culot cellulaire. Pour la réaction de conversion au bisulfite, utiliser cet échantillon de culot cellulaire et continuer avec la 2^e étape du protocole du fabricant.
- Buffer BL : ne pas ajouter d'ARN vecteur.
- Le volume d'élution de la conversion de l'ADN au bisulfite est de 50 µl de Buffer EB pour chaque échantillon.

- *iii) Conversion au bisulfite directement sur un échantillon cervical avec le QIAAsymphony Bisulfite Kit*

La conversion au bisulfite effectuée directement sur échantillon cervical collecté dans PreservCyt® Solution a été vérifiée pour le QIAAsymphony Bisulfite Kit de QIAGEN.

Consulter le manuel du QIAAsymphony Bisulfite Kit et réaliser le test conformément aux recommandations du fabricant.

- Prendre 2,5 % d'échantillon cervical dans le milieu de prélèvement PreservCyt® (c.-à-d. 500 µl à partir d'un volume de 20 ml) et culotter l'échantillon par centrifugation pendant 10 minutes à au moins 3 390 x g. Jeter le surnageant en laissant un maximum de 20 µl de milieu de prélèvement PreservCyt résiduel avec le culot cellulaire.
- Pour la réaction de conversion au bisulfite, suivre la fiche du protocole « QIAAsymphony SP – Bisulfite 140_HC_V » en commençant à l'étape 2, en utilisant le culot cellulaire à la place de l'ADN.
- Une fois la réaction de conversion au bisulfite terminée, démarrer un cycle SP sur l'appareil QIAAsymphony en suivant les étapes décrites dans le protocole « Conversion au bisulfite de cytosines non méthylées dans différents types d'échantillons » du manuel QIAAsymphony Bisulfite Kit. L'élution est réalisée dans 40 µl.

Préparation des échantillons pour les échantillons conservés dans un milieu SurePath™

Les échantillons conservés dans SurePath doivent être prétraités avant l'extraction de l'ADN. Le QIAsure Methylation Test a été validé pour une utilisation avec de l'ADN génomique traité au bisulfite obtenu à partir d'échantillons cervicaux selon la procédure définie ci-dessous.

- Prélever 2,5 % de l'échantillon cervical
- Centrifuger pendant 10 minutes à 4 000 g, retirer le surnageant, mais laisser 100 µl de SurePath™
- Ajouter 100 µl de Buffer AL et remettre en suspension le culot
- Bien mélanger, puis incuber pendant 20 minutes à 90 °C
- Laisser refroidir à température ambiante pendant 5 minutes
- Réaliser l'extraction de l'ADN avec le QIAamp DNA Mini Kit (ou équivalent) conformément aux instructions du fabricant, puis éluer l'ADN dans 50 µl.
- Mesurer la concentration de l'ADN, les systèmes adaptés sont le Qubit® Fluorometer, le NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (fabriqués tous deux par Thermo Fisher Scientific) ou les systèmes équivalents.
- 200 ng d'ADN est recommandé pour la conversion au bisulfite ; si 200 ng ne sont pas disponibles, utiliser le volume d'entrée maximum. Réaliser la conversion avec l'EZ DNA Methylation Kit ou l'EZ DNA Methylation-Lightning kit (Zymo) conformément aux instructions du fabricant. Utiliser 2,5 µl d'éluat pour le QIAsure Methylation Test.

Recommandations générales pour la conversion au bisulfite

La réaction de conversion au bisulfite doit être réalisée dans un endroit spécifique séparé du lieu de stockage et de distribution du QIAware Master Mix afin d'éviter la contamination des réactifs.

La quantité nécessaire pour la réaction QIAware est de 2,5 µl d'ADN converti au bisulfite.

Si le contrôle interne de la qualité des échantillons est négatif (c.-à-d. les valeurs de C_T pour ACTB sont $> 26,4$), la préparation d'ADN converti au bisulfite à partir du prélèvement a abouti à une quantité et/ou une qualité de matériel insuffisante, entraînant un résultat non valide. Respecter les étapes recommandées pour atteindre une C_T pour ACTB qui soit comprise dans la plage de validité comme suit :

- Conversion au bisulfite après l'extraction et le contrôle de la quantité d'ADN : Répéter la réaction de conversion au bisulfite avec une plus grande quantité d'échantillon d'ADN et/ou répéter l'isolement de l'ADN avec une plus grande quantité d'échantillon cervical.
- Conversion au bisulfite directement sur un échantillon cervical : Répéter la réaction de conversion au bisulfite avec 10 %* de l'échantillon cervical dans le milieu de prélèvement PreservCyt (c.-à-d. 2 ml à partir d'un volume de 20 ml).

L'ADN converti au bisulfite peut être stocké pendant un maximum de 24 heures à 2–8 °C, de 5 jours entre –25 et –15 °C et de 3 mois en dessous de –70 °C. Les cycles de congélation-décongélation répétés de l'ADN converti au bisulfite doivent être évités en toutes circonstances. Le nombre de cycles de congélation-décongélation ne doit pas dépasser trois pour maintenir une qualité suffisante.

* Le volume d'échantillon pour la conversion directe au bisulfite peut être augmenté quand le taux de réussite est insuffisant à cause de la variabilité de l'échantillonnage, par exemple suite à un échantillonnage inapproprié.

Protocole : QIAware Methylation Test dans l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*

Points importants avant le démarrage

- Prendre le temps de se familiariser avec l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM avant de démarrer le protocole. Consulter le manuel d'utilisation de l'appareil (N° de réf. 9002033 ou 9002032).
- Avant de lancer la première analyse de la journée, préchauffer le Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM à 95 °C pendant 10 minutes.
- Rotor-Gene AssayManager v1.0 permet l'interprétation automatisée des résultats de la PCR. Le kit QIAware doit être utilisé sur l'appareil Rotor-Gene Q MDx à l'aide de Rotor-Gene AssayManager v1.0. Prendre le temps de se familiariser avec Rotor-Gene AssayManager v1.0 (N° de réf. 9022739), ainsi qu'avec Epsilon Plug-In, et consulter leur manuel d'utilisation.
- Différents profils du dosage Rotor-Gene AssayManager v1.0 sont requis en fonction des types d'échantillons. Vérifier que le profil d'essai correct est utilisé pour chaque type d'échantillon, comme indiqué ci-dessous :
 - Le profil du dosage « QIAware pour frottis cervicaux » (à partir du fichier AP_QIAware_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) doit être utilisé pour les tests d'ADN converti au bisulfite obtenu à partir d'échantillons cervicaux effectués par un médecin
 - Le profil du dosage « QIAware pour les échantillons auto-prélevés par cytobrosse » (à partir du fichier AP_QIAware_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) doit être utilisé pour les tests d'ADN converti au bisulfite obtenu à partir d'échantillons vaginaux auto-prélevés par cytobrosse

* Appareil Rotor-Gene Q 5plex HRM avec janvier 2010 ou une date ultérieure comme date de production. La date de production peut être obtenue à partir du numéro de série à l'arrière de l'instrument. Le numéro de série est affiché au format « mmaannn » où « mm » correspond au mois de production en chiffres, « aa » correspond aux deux derniers chiffres de l'année de production et « nnn » est l'identifiant unique de l'appareil.

Remarque : un seul type d'échantillon peut être testé par expérience. Les différents profils du dosage ont été optimisés pour chaque type d'échantillon et il est essentiel que les clients choisissent le profil du dosage correct afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles pour chaque type d'échantillon.

À faire avant de commencer

- Le logiciel Rotor-Gene AssayManager version v1.0.x (avec x supérieur ou égal à 4) doit être installé sur l'ordinateur connecté au Rotor-Gene Q MDx. Pour plus de détails sur l'installation de l'application principale Rotor-Gene AssayManager v1.0, consulter le *manuel d'utilisation de Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application*.
- Le QIAsure Methylation Test requiert un module d'extension spécifique nommé « Epsilon Plug-in » (version 1.0.1 ou ultérieure) Ce module d'extension peut être téléchargé sur le site Web de QIAGEN : <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Ce module d'extension doit être installé sur un ordinateur sur lequel Rotor-Gene AssayManager version 1.0.x (avec x supérieur ou égal à 4) a déjà été installé.
- Le QIAsure Methylation Test requiert un profil du dosage spécifique pour être effectué à l'aide du logiciel Rotor-Gene AssayManager v1.0. Ce profil du dosage contient tous les paramètres nécessaires à l'exécution des cycles et de l'analyse de l'expérience. Il existe 2 QIAsure Assay Profiles :
 - Le profil du dosage « QIAsure pour frottis cervicaux » (à partir du fichier AP_QIAsure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) pour les échantillons cervicaux effectués par un médecin
 - Le profil du dosage « QIAsure pour les échantillons auto-prélevés par cytobrosse » (à partir du fichier AP_QIAsure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) pour les échantillons vaginaux auto-prélevés par cytobrosse. Ces profils peuvent être téléchargés depuis la page Web du QIAsure Methylation Test : <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Le profil du dosage doit être importé dans le logiciel Rotor-Gene AssayManager.

Remarque : le kit QIAware ne peut être utilisé que si certains paramètres de configuration sont programmés dans le logiciel Rotor-Gene AssayManager v1.0.

Pour garantir la sécurité des processus de l'ensemble du système, les paramètres de configuration suivants doivent être définis pour le mode fermé :

- « Material number required » (Référence produit requise)
- « Valid expiry date required » (Date d'expiration valide requise)
- « Lot number required » (Numéro de lot requis)

Installation d'Epsilon Plug-in et importation du profil du dosage

L'installation et l'importation d'Epsilon Plug-in et du profil du dosage sont décrites dans le *manuel d'utilisation de Rotor-Gene AssayManager Core Application* et dans le *manuel d'utilisation d'Epsilon Plug-In*.

- Télécharger le plug-in Epsilon et la dernière version du QIAware Assay Profile sur le site Web de QIAGEN.
- Lancer le processus d'installation en double-cliquant sur le fichier EpsilonPlugin.Installation.msi, puis suivre les instructions d'installation. Pour une description du processus, consulter la section « Installation des modules d'extension » dans le *manuel d'utilisation d'AssayManager Core Application*.

Remarque : pour garantir la sécurité des processus de l'ensemble du système, sélectionner l'onglet **Settings** (Paramètres) et cocher les cases pour **Material number required** (Référence produit requise), **Valid expiry date required** (Date d'expiration valide requise) et **Lot number required** (Numéro de lot requis) pour le mode fermé (section **Work list** [Liste de tâches]). Si les cases ne sont pas activées (cochées), cliquer pour les activer.

- Après l'installation du module d'extension, un utilisateur disposant des droits d'administrateur pour le logiciel Rotor-Gene AssayManager doit importer le profil du dosage AP_QIAware_V1_0_Y.iap selon la procédure suivante.



1. Ouvrir le logiciel Rotor-Gene AssayManager en cliquant sur l'icône. La fenêtre du logiciel Rotor-Gene AssayManager s'ouvre (Figure 1).

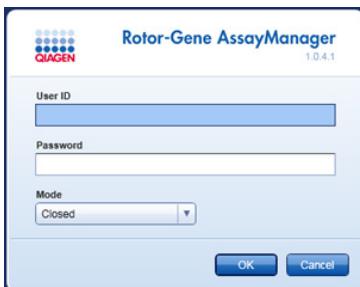
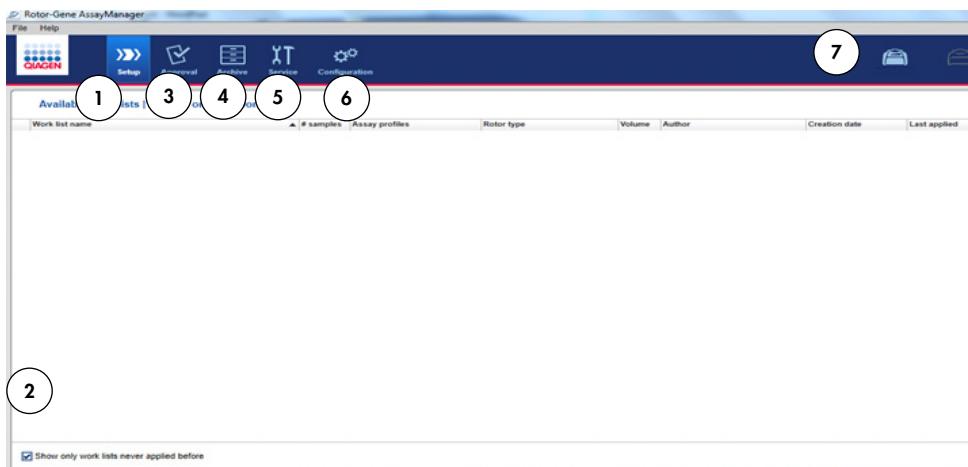


Figure 1. Écran de connexion au logiciel Rotor-Gene AssayManager.

2. Utiliser votre identifiant et votre mot de passe pour vous connecter à Rotor-Gene AssayManager. Ne pas modifier le mode « Closed » (Fermé). Cliquer sur OK. L'écran Rotor-Gene AssayManager s'ouvre (voir ci-dessous).



- 1 Onglet Set-up (Configuration). Cet onglet permet de gérer et d'ajouter des listes de tâches.
- 2 Si cette case est cochée, seules les nouvelles listes de tâches sont affichées.
- 3 Onglet Approval (Approbation). Cet onglet permet de retrouver des expériences précédentes (analyses).
- 4 Onglet Archive. Vous permet de retrouver d'anciennes expériences (analyses) qui ont déjà été approuvées.
3. Sélectionner l'environnement de configuration.
4. Sélectionner l'onglet Assay Profiles (Profils du dosage).
5. Cliquer sur Import (Importer).
6. Sélectionner le profil du dosage AP_QIAsure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap pour les échantillons cervicaux et/ou le profil du dosage AP_QIAsure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap à importer dans la boîte de dialogue, puis cliquer sur Open (Ouvrir).



7. Une fois le profil du dosage importé avec succès, il peut être utilisé dans l'environnement « Setup » (Configuration).

Remarque : il n'est pas possible d'importer deux fois la même version d'un profil du dosage.

Traitement des échantillons sur les appareils Rotor-Gene Q MDx avec rotor à 72 tubes

Jusqu'à 70 échantillons d'ADN converti au bisulfite peuvent être testés dans la même analyse (expérience), en plus d'un calibrateur et d'un contrôle sans matrice (no template control, NTC). Le schéma dans le Tableau 1 constitue un exemple de configuration du bloc de chargement ou du rotor pour une analyse avec le QIAsure Methylation Test. Les chiffres indiquent les positions dans le bloc de chargement et la position finale dans le rotor.

Tableau 1. Configuration de la plaque et du rotor pour une analyse avec le kit QIAsure sur l'appareil Rotor-Gene Q MDx

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

ATTENTION



Les tubes doivent être insérés dans le rotor comme indiqué dans le Tableau 1. L'analyse automatisée définie dans le profil du dosage est basée sur cette organisation. Une disposition différente risque d'entraîner des résultats aberrants.

Remarque : remplir toutes les positions inutilisées avec des tubes vides.

PCR sur les instruments Rotor-Gene Q MDx avec rotor à 72 tubes

Avant de lancer la première analyse de la journée, préchauffer le Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM à 95 °C pendant 10 minutes.

1. Créer une liste de tâches pour l'échantillon à traiter selon la procédure suivante :
 - 1a. Mettre l'appareil Rotor-Gene Q MDx sous tension.
 - 1b. Ouvrir le logiciel Rotor-Gene AssayManager et se connecter en tant qu'utilisateur avec un rôle d'opérateur en mode fermé.
 - 1c. Cliquer sur New work list (Nouvelle liste de tâches) dans le gestionnaire de liste de tâches (environnement « Setup » [Configuration]).
 - 1d. Sélectionner le QIAsure Assay Profile depuis la liste des profils du dosage disponibles.
Remarque : le profil du dosage AP_QIAsure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap correspond aux échantillons cervicaux ; le profil du dosage AP_QIAsure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap correspond aux échantillons vaginaux autoprélevés à l'aide d'une brosse.
Remarque : un seul type d'échantillon peut être testé par expérience.
 - 1e. Cliquer sur Move (Déplacer) pour transférer le profil du dosage sélectionné vers la liste Selected assay profiles (Profils du dosage sélectionnés). Le profil du dosage doit maintenant s'afficher dans la liste « Selected assay profiles » (Profils du dosage sélectionnés).
 - 1f. Saisir le nombre d'échantillons dans le champ correspondant.
 - 1g. Saisir les informations suivantes relatives au kit QIAsure, qui sont imprimées sur le couvercle de la boîte :
 - Référence produit : 1102417
 - Date d'expiration valide dans le format AAAA-MM-JJ
 - Numéro de lot

- 1h. Sélectionner l'étape Samples (Échantillons). Une liste avec les informations d'échantillon apparaît sur l'écran d'AssayManager. Cette liste représente la disposition attendue du rotor.
- 1i. Saisir le ou les numéros d'identification d'échantillons dans la liste ainsi que les éventuelles informations optionnelles sur les échantillons sous la forme d'un commentaire pour chaque échantillon.
- 1j. Sélectionner l'étape Properties (Propriétés) et saisir un nom de liste de tâches (Figure 2).

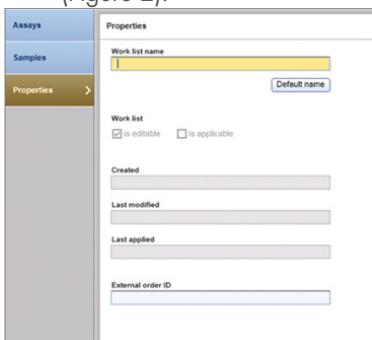


Figure 2. Propriétés

- 1k. Cocher la case *is applicable* (est applicable) et cliquer sur *Apply* (Appliquer).
- 1l. Enregistrer la liste de tâches.
Il est possible d'imprimer la liste de tâches, ce qui peut s'avérer utile lors de la préparation et de la configuration de la PCR. Pour imprimer la liste de tâches, cliquer sur *Print work list* (Imprimer la liste de tâches). Les informations d'échantillon sont incluses dans cette liste de tâches.

Remarque : la liste de tâches peut être soit créée une fois que l'analyse est définie sur l'appareil, soit enregistrée avant d'ajouter les échantillons dans l'appareil.

2. Configurer l'analyse QIAsure.

Afin de réduire le risque de contamination de la PCR, il est fortement recommandé d'utiliser une hotte de PCR avec fonction d'irradiation UV.

La distribution du QIAsure Master Mix doit être effectuée dans une zone séparée de celle dans laquelle la réaction de conversion au bisulfite de l'ADN est réalisée.

Nettoyer la paillasse, les pipettes et le porte-tubes avant l'utilisation avec une solution de dégradation d'ADN afin d'éviter la contamination du modèle ou des nucléases.

Remarque : changer de pointe entre chaque tube afin d'éviter toute contamination avec une matrice non spécifique ou un mélange réactionnel, ce qui pourrait entraîner des résultats faux positifs.

2a. Décongeler complètement le QIAsure Master Mix et le QIAsure Calibrator et protéger le QIAsure Master Mix de la lumière autant que possible.

Remarque : l'étape de décongélation ne doit pas dépasser 30 minutes afin d'éviter toute dégradation des produits.

- 2b. Mélanger délicatement par inversion 10 fois, puis centrifuger brièvement avant utilisation.
- 2c. Ajouter 17,5 µl de QIAsure Master Mix prêt à l'emploi dans les tubes en barrettes appropriés. La préparation des réactions peut être faite à température ambiante.
- 2d. Remettre le QIAsure Master Mix dans le congélateur pour éviter toute dégradation.
- 2e. Transporter les tubes dans une zone différente pour ajouter les contrôles de dosage et les échantillons traités au bisulfite.
- 2f. Ajouter 2,5 µl d'eau au contrôle sans matrice (no template control, NTC) en position 2 (voir Tableau 1 plus haut). Mélanger délicatement par aspiration-refoulement avec la pipette.
- 2g. Ajouter 2,5 µl de QIAsure Calibrator en position 1 (voir Tableau 1 plus haut). Mélanger délicatement par aspiration-refoulement et fermer le tube avec un bouchon.
- 2h. Ajouter 2,5 µl d'ADN converti au bisulfite dans le tube correspondant. Mélanger délicatement par aspiration-refoulement avec la pipette.
- 2i. Une fois qu'un ensemble de 4 tubes a été rempli, fermer les tubes avec les bouchons.

Remarque : les tubes de PCR peuvent être conservés pendant 30 minutes entre le pipetage des échantillons dans les tubes de PCR et le début de l'expérience dans la machine entre 2 et 8 °C dans l'obscurité.

- 2j. Remettre le QIAsure Calibrator dans le congélateur pour éviter toute dégradation du produit.

Remarque : changer de pointe entre chaque tube afin d'éviter toute contamination avec une matrice non spécifique ou un mélange réactionnel, ce qui pourrait entraîner des résultats faux positifs.

3. Préparer le Rotor-Gene Q MDx et démarrer l'analyse (l'expérience) comme suit :

- 3a. Placer un rotor à 72 puits sur le support de rotor.
- 3b. Remplir le rotor avec les tubes en barrettes conformément aux positions attribuées, en commençant par la position 1, comme indiqué dans le Tableau 1, et en plaçant des tubes en barrettes vides et bouchés dans toutes les positions non utilisées.

Remarque : veiller à ce que le premier tube soit inséré en position 1 et que l'orientation et les positions des barrettes de tubes soient correctes, comme indiqué sur le Tableau 1.

- 3c. Fixer la bague de verrouillage.
- 3d. Charger le rotor avec la bague de verrouillage sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx, puis fermer le couvercle de l'instrument.
- 3e. Dans le logiciel Rotor-Gene AssayManager v1.0, sélectionner la liste de tâches correspondante dans le gestionnaire de listes de tâches et cliquer sur **Apply (Appliquer)** ou, si la liste de tâches est encore ouverte, cliquer sur **Apply (Appliquer)**.

Remarque : si aucune liste de tâches n'a été créée pour l'expérience, se connecter à Rotor-Gene AssayManager v1.0 et suivre l'étape 1 avant de continuer.

- 3f. Saisir le nom de l'analyse (l'expérience).
 - 3g. Sélectionner le thermocycleur à utiliser dans la boîte de dialogue **Cycler selection (Sélection du thermocycleur)**.
 - 3h. Vérifier que la bague de verrouillage est bien fixée et le confirmer à l'écran.
 - 3i. Cliquer sur **Start experiment (Démarrer l'expérience)**.
- Le QIAsure Methylation Test devrait commencer.

4. Lorsque le test est terminé, cliquer sur **Finish run (Terminer l'analyse)**.

5. Valider et approuver le cycle.

- Pour les utilisateurs connectés avec un rôle « Approver » (Approbateur), cliquer sur Release and go to approval (Valider et passer à l'approbation).
- Pour les utilisateurs connectés avec un rôle « Operator » (Opérateur), cliquer sur Release (Valider).

6. Valider les résultats.

- Si un utilisateur a cliqué sur Release and go to approval (Valider et passer à l'approbation), les résultats de l'expérience s'affichent.
- Si un utilisateur avec un rôle « Operator » (Opérateur) a cliqué sur Release (Valider), un utilisateur avec un rôle « Approver » (Approbateur) doit se connecter et sélectionner l'environnement « Approval » (Approbation).
- Filtrer le dosage à approuver en sélectionnant les options de filtrage puis en cliquant sur Apply (Appliquer).
- Examiner et approuver les résultats de chaque échantillon de test.

Dérouler la liste du tableau « Results » (Résultats) jusqu'à l'échantillon qui doit être approuvé. Chaque résultat d'échantillon à approuver présente trois boutons radio à la fin de la rangée dédiée.

Selectionner Accept (Accepter) ou Reject (Rejeter) pour accepter ou rejeter le résultat d'échantillon.

Remarque : un résultat automatiquement défini comme INVALID (non valide) par Rotor-Gene AssayManager ne peut plus être converti en résultat valide, même si le résultat est rejeté.

Étape facultative : saisir un commentaire dans la colonne « Sample comment » (Commentaire sur l'échantillon).

- Cliquer sur Release/Report data (Valider/rapporter les données).
- Cliquer sur OK. Le rapport est généré au format .pdf et enregistré automatiquement dans le dossier prédéfini. Par défaut, le chemin d'accès à ce dossier est le suivant : QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports

Remarque : il est possible de modifier ce chemin d'accès ainsi que le dossier dans l'environnement « Configuration ».

- Aller dans l'onglet Archive pour exporter le fichier .rex correspondant aux données brutes. Retrouver votre expérience en utilisant les options de filtrage et cliquer sur show assays (afficher les dosages). Ensuite, cliquer sur Export .rex file (Exporter le fichier .rex) et l'enregistrer en cliquant sur OK. Le logiciel enregistre automatiquement le fichier .rex dans le dossier prédéfini suivant : **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments**

Remarque : il est possible de modifier ce chemin d'accès et ce dossier dans l'onglet Specify the .rex file export destination (Spécifier la destination d'exportation du fichier .rex).

Remarque : pour la résolution de problèmes, il est nécessaire de disposer d'un support technique pour le test. Il est possible de générer des packages de support dans l'environnement « Approval » (Approbation) ou « Archive ». Voir le *manuel d'utilisation de Rotor-Gene AssayManager Core Application*, chapitre « Résolution de problèmes », section « Création d'un package de support » à l'adresse <https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>.

En outre, il peut être utile de disposer de la piste d'audit à partir de l'incident ± 1 jour. La piste d'audit peut être récupérée dans l'environnement Service (*manuel d'utilisation de Rotor-Gene AssayManager Core Application*).

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

Interprétation des résultats

L'analyse est entièrement automatisée.

Rotor-Gene AssayManager v1.0 analyse d'abord les courbes d'amplification et peut invalider des courbes non conformes, en fonction de leur forme et de l'amplitude du bruit. Si tel est le cas, un avertissement est associé à la courbe invalidée (voir Tableau 2).

Rotor-Gene AssayManager v1.0 analyse ensuite les contrôles d'analyse :

- Calibrateur
- NTC

Remarque : le rapport généré à la fin de l'analyse indique les résultats obtenus pour les contrôles d'analyse, les avertissements invalidants étant indiqués en regard des données non valides.

Si tous les contrôles de l'analyse sont conformes, alors Rotor-Gene AssayManager analyse les échantillons inconnus.

Le Tableau 2 rassemble les avertissements invalidants pour les échantillons qui peuvent être attribués à un tube donné lors de l'analyse par Rotor-Gene AssayManager v1.0, ainsi qu'une explication de leur signification.

Tableau 2. Avertissements invalidants pour les échantillons et description des termes

Avertissement	Comportement	Description
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Invalide)	La valeur cible est supérieure à la plage définie. Il peut s'agir d'une valeur de C_T , de la fluorescence finale, d'une concentration ou d'une valeur calculée, p. ex. C_T moyenne ou ΔC_T .
ASSAY_INVALID	Invalid (Invalide)	le dosage est non valide, car au moins un contrôle externe n'est pas valide.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Invalide)	La valeur cible est inférieure à la plage définie. Il peut s'agir d'une valeur de C_T , de la fluorescence finale, d'une concentration ou d'une valeur calculée, p. ex. C_T moyenne ou ΔC_T .
CONSECUTIVEFAULT	Invalid (Invalide)	Une cible utilisée pour le calcul de cette cible n'est pas valide.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Invalid (Invalide)	La courbe d'amplification des données brutes dévie par rapport au comportement établi pour ce dosage. La probabilité de résultats incorrects ou d'une mauvaise interprétation est très élevée.
FLAT_BUMP	Invalid (Invalide)	La courbe d'amplification des données brutes présente une forme de bosse aplatie qui s'écarte du comportement établi pour ce dosage. La probabilité de résultats incorrects ou d'une mauvaise interprétation est élevée (p. ex. détermination incorrecte de la valeur de CT).
IN_ACCEPTED_RANGE	Valid (Valide)	Les valeurs de C_T du signal du NTC sont au-dessus de 36 pour l'ACTB cible.
INVALID_CALCULATION	Invalid (Invalide)	Le calcul a échoué pour cette cible.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Invalid (Invalide)	La courbe d'amplification franchit la valeur seuil plusieurs fois. Il est impossible de déterminer une valeur de C_T sans ambiguïté.
NO_BASELINE	Invalid (Invalide)	Aucune valeur de départ pour la ligne de base initiale n'a été trouvée.
NO_CT_DETECTED	Variable	Aucune valeur de C_T n'est détectée pour cette cible.
NO_VALUE	Invalid (Invalide)	La cible n'a pas de valeur alors qu'elle est censée en avoir une. Il n'est pas nécessaire que cette valeur se situe dans une certaine plage. Il peut s'agir d'une valeur de C_T , de la fluorescence finale, d'une concentration ou d'une valeur calculée, p. ex. C_T moyenne ou ΔC_T .
NORM_FACTOR_ALTERATION	Avertissement	Dérive lors de la procédure de normalisation. La courbe d'amplification présente une normalisation par défaut ; l'exactitude des résultats doit être vérifiée manuellement.

Tableau 2. Avertissements invalidants pour les échantillons et description des termes

OTHER_TARGET_INVALID	Invalid (Invalide)	Une autre cible du même échantillon est non valide.
SATURATION	Invalid (Invalide)	La fluorescence des données brutes présente une forte saturation avant le point d'infexion de la courbe d'amplification.
SATURATION_IN_PLATEAU	Avertissement	La fluorescence des données brutes présente une saturation dans la phase de plateau de la courbe d'amplification.
SPIKE (PIC)	Avertissement	Un pic dans la fluorescence des données brutes est détecté dans la courbe d'amplification, mais en dehors de la région de détermination de la valeur de C_T .
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Invalid (Invalide)	Un pic est détecté dans la courbe d'amplification à proximité de la valeur de C_T .
STEEP_BASELINE	Invalid (Invalide)	Une augmentation brutale de la ligne de base dans la fluorescence des données brutes est détectée dans la courbe d'amplification.
STRONG_BASELINE_DIP	Invalid (Invalide)	Une chute brutale de la ligne de base de la fluorescence des données brutes est détectée dans la courbe d'amplification.
STRONG_NOISE	Invalid (Invalide)	Détection d'un bruit de fond élevé en dehors de la phase de croissance de la courbe d'amplification.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Invalid (Invalide)	Détection d'un bruit de fond élevé dans la phase de croissance (exponentielle) de la courbe d'amplification.
UNCERTAIN	Variable	Les résultats du balayage automatique des données (AUDAS) sont en contradiction avec ceux de l'analyse principale. Il n'est pas possible de réaliser une évaluation automatique sans ambiguïté de la validité des données.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Variable	Une valeur de C_T est détectée pour une cible qui n'aurait pas dû être amplifiée.
UNEXPECTED_VALUE	Invalid (Invalide)	La cible a une valeur, mais il ne s'agit pas d'une valeur attendue. Il peut s'agir d'une valeur de C_T , de la fluorescence finale, d'une concentration ou d'une valeur calculée, p. ex. C_T moyenne ou ΔC_T .
UPSTREAM	Variable	<p>L'état de l'échantillon a été déterminé comme étant Invalid (Non valide) ou Unclear (Incertain) par un processus en amont (p. ex. QIAsymphony).</p> <p>Remarque : pour les échantillons indiqués comme incertains, le comportement de Rotor-Gene AssayManager est défini dans l'environnement « Configuration » du logiciel AssayManager. Les avertissements « Invalid » (non valide) provenant de processus en amont entraînent toujours la détermination de l'échantillon correspondant comme non valide dans le logiciel Rotor-Gene AssayManager.</p>

Tableau 2. Avertissements invalidants pour les échantillons et description des termes

WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Invalid (Invalide)	Une ondulation de ligne de base dans la fluorescence des données brutes est détectée dans la courbe d'amplification.
------------------------	--------------------	--

- Si tous les contrôles de l'analyse sont valides, Rotor-Gene AssayManager v1.0 analyse les échantillons inconnus. Dans l'échantillon, une quantité minimale d'ADN converti au bisulfite doit être présente pour que les résultats soient interprétés. Cela est indiqué par la valeur de C_T du gène domestique ACTB, qui doit être $\leq 26,4$ pour qu'un échantillon soit validé par Rotor-Gene AssayManager.
- Les valeurs de $\Delta\Delta C_T$ pour *FAM19A4* et *hsa-mir124-2* sont ensuite calculées et le résultat est donné. Si une valeur de $\Delta\Delta C_T$ est en dessous de la valeur seuil, la cible est marquée « Hypermethylation positive » (Positif à l'hyperméthylation).
Remarque : les niveaux partiels ou faibles de méthylation sont un phénomène naturel qui, contrairement aux niveaux d'hyperméthylation, ne sont pas liés directement au développement du cancer.
- Un échantillon est considéré comme « Hypermethylation positive » (Positif à l'hyperméthylation) quand au moins l'une des cibles est marquée « Hypermethylation positive » (Positif à l'hyperméthylation).
- Les échantillons avec une qualité/quantité d'ADN insuffisante (c.-à-d. valeurs de C_T pour ACTB juste dans les limites du critère d'acceptation ; valeurs de C_T entre 25 et 26,4) peuvent être marqués comme faux négatifs. Répéter le test PCR individuellement. Un résultat négatif au test répété signifie que l'échantillon est négatif à l'hyperméthylation ; un résultat positif signifie qu'il est positif à l'hyperméthylation.
- Les échantillons présentant une cellularité élevée traités avec un protocole de conversion directe posent un risque de surcharge de la réaction PCR avec l'ADN, pouvant entraîner un résultat faux négatif pour la cible *FAM19A4*. Par conséquent, pour les échantillons avec 1) un résultat négatif à l'hyperméthylation, 2) une valeur C_T ACTB ≤ 23 et 3) une valeur $\Delta\Delta C_T$ *FAM19A4* entre 10,36 et 11,36, il est conseillé de répéter la PCR avec 5 fois moins d'entrée d'ADN converti en diluant l'échantillon dans de l'eau.

Guide de résolution de problèmes

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

Pour des informations sur la résolution de problèmes de Rotor-Gene AssayManager, consulter le *manuel d'utilisation de Rotor-Gene AssayManager Core Application*.

Commentaires et suggestions

Manipulation générale

Concentration en ADN de l'échantillon trop faible pour le traitement au bisulfite

Vérifier l'extrait d'ADN

Répéter l'extraction d'ADN avec un échantillon clinique plus concentré

L'échantillon est marqué non valide : l'amplification de l'ACTB est trop faible ou inexiste

a) Erreur de pipetage ou réactifs omis

Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Répéter l'analyse de PCR.

b) Vérifier le concentré d'ADN

Augmenter au maximum la quantité d'ADN pour la conversion au bisulfite. Les performances de la réaction de conversion au bisulfite sont optimales pour une quantité d'ADN comprise dans une plage de 100 ng–2 µg

c) Pour le protocole « Conversion au bisulfite directement sur un échantillon cervical », vérifier la cellularité de l'échantillon clinique.

Répéter la réaction de conversion au bisulfite avec 10 % de l'échantillon cervical dans le milieu de prélèvement PreservCyt (c.-à-d. 2 ml à partir d'un volume de 20 ml).

d) Vérifier l'éluat converti au bisulfite

Répéter le traitement au bisulfite ; le cas échéant, une plus grande quantité d'ADN peut être utilisée.

L'échantillon est marqué non valide : les cibles *FAM19A4* et/ou *hsa-mir124-2* ne sont pas valides

Mélange insuffisant

Mélanger l'échantillon et le mélange réactionnel par pipetage par aspiration-refoulement (environ 10 fois par tube). Répéter l'analyse de l'échantillon.

Commentaires et suggestions

Le contrôle positif est considéré comme non valide : l'amplification est trop basse ou absente pour une ou plusieurs cibles

- a) Erreur de pipetage ou réactifs omis Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Répéter l'analyse de PCR.
- b) Dégradation partielle Stocker le contenu du kit entre -30 et -15 °C. Limiter les congélations et décongélations répétées à un maximum de trois cycles.
- c) Réactifs de PCR partiellement dégradés Stocker le contenu du kit entre -30 et -15 °C et conserver les mélanges réactionnels à l'abri de la lumière. Éviter les cycles de congélation-décongélation répétés.
- d) Inversion de tubes en barrettes Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.
- e) Date d'expiration Vérifier la date de péremption du kit utilisé.
- f) Délai entre le pipetage des échantillons et le début de l'analyse Les mélanges réactionnels de PCR peuvent être stockés à 2–8 °C pendant 30 minutes dans l'obscurité entre la distribution des échantillons dans les réactions de PCR et le lancement de l'analyse sur l'appareil.

Contrôle sans matrice (No template control, NTC) non valide

- a) Erreur de pipetage Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Répéter l'analyse de PCR.
- b) Contamination croisée Remplacer tous les réactifs critiques. Toujours manipuler les échantillons, les composants du kit et les consommables en accord avec les pratiques communément admises pour prévenir les transferts de contaminations.
- c) Contamination des réactifs Remplacer tous les réactifs critiques. Toujours manipuler les échantillons, les composants du kit et les consommables en accord avec les pratiques communément admises pour prévenir les transferts de contaminations.
- d) Inversion de tubes en barrettes Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.
- e) Délai entre le pipetage des échantillons et le début de l'analyse Les mélanges réactionnels de PCR peuvent être stockés à 2–8 °C pendant 30 minutes dans l'obscurité entre la distribution des échantillons dans les réactions de PCR et le lancement de l'analyse sur l'appareil.
- f) Dégradation de la sonde Conserver les mélanges réactionnels à l'abri de la lumière. Vérifier les faux positifs sur la courbe de fluorescence.

Signaux faibles ou absents pour les échantillons, mais les contrôles sont OK

- a) Effets inhibiteurs Toujours vérifier qu'il ne reste pas de tampon sur le filtre après centrifugation pendant la conversion au bisulfite. Répéter la conversion au bisulfite.
- b) Erreur de pipetage Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Répéter l'analyse de PCR.

Si le problème persiste, contacter les services techniques QIAGEN.

Limitations

Les réactifs du QIAsure Methylation Test ne peuvent être utilisés que dans le cadre de diagnostics in vitro.

L'utilisation des tests de PCR nécessite de bonnes pratiques de laboratoire, incluant la maintenance de l'équipement, spécifiques à la biologie moléculaire et en accord avec les réglementations applicables et les normes pertinentes.

Les réactifs et les instructions fournis dans ce kit ont été validés pour obtenir des performances optimales.

Le QIAsure Methylation Test doit être utilisé par des professionnels de laboratoire formés à l'utilisation des appareils Rotor-Gene Q MDx et du logiciel Rotor-Gene AssayManager v1.0.

L'utilisation de ce produit est réservée à un personnel spécialement formé aux techniques de Real-time PCR et aux procédures de diagnostic in vitro. Tous les résultats diagnostiques générés doivent être interprétés à la lumière des autres observations cliniques ou résultats biologiques disponibles.

Pour obtenir les meilleurs résultats de PCR possible, se conformer strictement au manuel d'utilisation.

Il convient de porter une attention particulière aux dates de péremption imprimées sur l'emballage et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants périssés.

Les échantillons avec une qualité/quantité d'ADN insuffisante (c.-à-d. valeurs de C_T pour ACTB juste dans les limites du critère d'acceptation ; valeurs de C_T entre 25 et 26,4) peuvent être marqués comme faux négatifs. Répéter le test individuellement. Un résultat négatif au test répété signifie que l'échantillon est négatif à l'hyperméthylation ; un résultat positif signifie qu'il est positif à l'hyperméthylation.

Tous les réactifs fournis dans le QIAsure Methylation Test sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans le même kit. Sinon, cela pourrait affecter les performances.

Le QIAsure Methylation Test a été validé pour les femmes positives au HPV.

Le QIAsure Methylation Test a été validé pour les échantillons cervicaux collectés et stockés dans les milieux PreservCyt, SurePath™ ou STM, ainsi que pour les échantillons vaginaux auto-prélevés par cytobrosse et stockés dans un milieu PreservCyt dès son arrivée au laboratoire.

Seul le Rotor-Gene Q MDx a été validé pour une utilisation avec le dosage de PCR QIAsure Methylation Test.

Toute utilisation non conforme avec les informations portées sur l'étiquetage ou la notice de ce produit et/ou modification de l'un de ses composants décharge Self-screen B.V. de toute responsabilité.

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

Caractéristiques de performances

Limite de détection (LOD)

La sensibilité analytique du QIAsure Methylation Test a été déterminée comme la limite de détection avec un niveau de confiance de 95 % (LOD 95 %) à l'aide de dilutions en série d'un plasmide contenant les séquences des trois amplicons (c.-à-d. *ACTB*, *FAM19A4* et *hsa-mir 124-2* ; plage de 750 000 à 0,25 copies par PCR). La LOD 95 % a été évaluée pour les cibles comme étant la plus faible dilution de plasmide donnant au moins 35 résultats positifs sur 36 ($C_T < 40$). Un total de 12 expériences a été réalisé par quatre opérateurs différents (1 analyse par opérateur par jour) à l'aide de trois lots différents et de trois systèmes RGQ différents. Chaque expérience comprenait des tests en triplicat de 11 dilutions de plasmide. La LOD 95 % était de 7,5 copies par PCR pour les trois cibles.

Linéarité

La linéarité du dosage QIAsure a été déterminée à partir des données des 12 expériences effectuées pour évaluer la LOD 95 %. Les deux gènes cibles, *FAM19A4* et *hsa-mir124-2*, et le gène de référence *ACTB* ont une amplification linéaire entre 750 000 et 7,5 copies par PCR.

Précision

La précision du QIAsure Methylation Test a été déterminée comme la variabilité intradosage (variabilité entre plusieurs résultats d'échantillons de même concentration au sein d'une même expérience) et la variance totale du dosage (variabilité de plusieurs résultats d'un dosage obtenus par des opérateurs différents, sur des appareils différents, avec des lots différents, dans des laboratoires différents). Les tests ont été effectués sur de l'ADN converti au bisulfite obtenu à partir d'un échantillon cervical positif au HPV à haut risque, qui était positif à l'hyperméthylation avec des signaux pour *FAM19A4* et *hsa-mir124-2* correspondant à 3 fois la concentration de la LOD. Les tests ont été effectués en duplicat dans 8 analyses effectuées par quatre opérateurs différents (une analyse par opérateur et par jour) à l'aide de deux lots différents et de trois appareils RGQ différents dans deux laboratoires différents, soit 16 points de données par échantillon. Le coefficient de variation (CV) a été déterminé pour les valeurs de C_T et de $\Delta\Delta C_T$ (Tableau 3).

Tableau 3. CV (en %) des valeurs de CT et de $\Delta\Delta CT$ dans un échantillon cervical positif à la méthylation

	Type d'échantillon	Type d'échantillon (%)	Type d'échantillon (%)
Valeur CT	Contrôle interne de la qualité des échantillons (c.-à-d. ACTB)	0,3	1,32
	FAM19A4	1,02	1,52
	hsa-mir124-2	1,16	1,64
Valeur $\Delta\Delta CT$	FAM19A4	3,70	5,97
	hsa-mir124-2	4,21	5,75

La dispersion statistique globale des valeurs de C_T d'un échantillon avec la concentration indiquée est de 1,32 % pour le contrôle interne de la qualité des échantillons (ACTB), 1,52 % pour *FAM19A4* et 1,64 % pour *hsa-mir124-2*. La dispersion statistique globale des valeurs de $\Delta\Delta C_T$ d'un échantillon avec la concentration indiquée est de 5,97 % pour *FAM19A4* et 5,75 % pour *hsa-mir124-2*.

Substances interférentes

Les substances inhibitrices sélectionnées pour leur effet potentiel sur la PCR étaient le tampon de désulfonation et de lavage du kit de conversion au bisulfite. Les substances potentiellement présentes dans l'échantillon d'origine n'ont pas été testées, compte tenu du fait que l'ADN de l'échantillon est purifié à deux reprises sur des billes de silice, c'est-à-dire pendant l'extraction d'ADN de l'échantillon d'origine et le rinçage de l'ADN après conversion au bisulfite. Les traces de tampon de désulfonation et de lavage ont entraîné des interférences dans la PCR, qui ont été détectées par un résultat non valide pour le contrôle interne de la qualité des échantillons.

Performances cliniques

Échantillons cervicaux positifs au HPV*

Les performances cliniques du QIAware Methylation Test pour les néoplasies intraépithéliales cervicales de grade 3 (CIN 3) et le cancer du col de l'utérus (c.-à-d. CIN 3+) ont été évaluées lors d'une étude rétrospective multicentrique réalisée sur le territoire de l'Union européenne (13). Le QIAware Methylation Test a été évalué avec 2 384 échantillons de dépistage cervical positifs pour le HPV prélevés chez des femmes (âgées de 29 à 76 ans) et dérivés de quatre pays de l'UE (Écosse, Slovénie, Danemark et Pays-Bas) (13). Les échantillons ont été collectés dans un milieu PreservCyt ou SurePath. La population de l'étude comprenait 2 012 femmes ne présentant aucun signe de maladie durant une période de suivi de 2 ans (abrévées sous la forme \leq CIN 1), 124 avec une CIN 2, 228 avec une CIN 3 et 20 avec un cancer. L'ADN a été extrait des échantillons cervicaux et 250 ng d'ADN ont été utilisés pour la réaction de conversion au bisulfite (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Sur les 250 ng d'ADN traité, 20 % ont été utilisés dans la PCR (ce qui correspondait à 50 ng de l'ADN cible d'origine/PCR). Les taux de positivité globaux pour les taux de positivité du QIAware Methylation Test stratifiés par critère clinique sont indiqués ci-dessous (Tableau 4).

Tableau 4. Taux de positivité du QIAware Methylation Test

Critère clinique	Fraction	Taux de positivité (IC 95 %)
\leq CIN 1	437/2012	21,7 % (20,23,6)
CIN 2	58/124	46,8 % (38,1-56,6)
CIN 3	176/228	77,2 % (71,3-82,2)
Cancer du col de l'utérus	19/20	95,0 % (70,7-99,3)

Parmi les échantillons cervicaux positifs au HPV à haut risque, la sensibilité pour CIN 3+ était de 78,6 % (195/248 ; IC 95 % : 73,1 à 88,3) et la spécificité globale du QIAware Methylation Test était de 78,3 % (n = 2 013 ; IC 95 % : 76 à 80). La valeur prédictive négative de résultats positifs au hrHPV et négatifs à la méthylation était de 99,9 % pour le cancer du col de l'utérus (n = 1 694 ; IC 95 % : 99,6 à 99,99), de 96,9 % pour CIN 3+ (IC 95 % : 96 à 98) et de 93,0 % pour CIN 2+ (IC 95 % : 92 à 94).

* Échantillons cervicaux effectués par un médecin.

En outre, la sensibilité au cancer du col de l'utérus a été évaluée dans le cadre d'une étude rétrospective et multicentrique mondiale sur 519 cancers invasifs avec différents histotypes de plus de 25 pays (11). L'ADN a été extrait des échantillons cervicaux et 250 ng d'ADN ont été utilisés pour la réaction de conversion au bisulfite (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Sur les 250 ng d'ADN traité, 20 % ont été utilisés dans la PCR (ce qui correspondait à 50 ng de l'ADN cible d'origine/PCR). 510 cancers sur 519 ont produit un résultat positif avec le QIAxure Methylation Test, soit un taux de positivité de 98,3 % (IC 95 % : 96,7 à 99,2), les taux de positivité stratifiés par histotype sont indiqués ci-dessous dans le Tableau 5. Taux de positivité du QIAxure Methylation Test sur des échantillons de cancer du col de l'utérus.

Tableau 5. Taux de positivité du QIAxure Methylation Test sur des échantillons de cancer du col de l'utérus

Critère clinique	Fraction	Taux de positivité (IC 95 %)
Carcinome épidermoïde	313/318	98,4 % (96,4-99,5)
Adénocarcinome	121/123	98,4 % (94,2-99,8)
Carcinome adéno-squameux	42/42	100,0 % (91,6-100)
Histotypes de cancer rares	30/32	93,8 % (79,2-99,2)
Histotype de cancer non spécifié	4/4	100 % (39,8-100,0)

Échantillons vaginaux auto-prélevés par cytobrosse positifs au HPV

Les performances cliniques du QIASure Methylation Test pour la détection des néoplasies intraépithéliales cervicales de grade 3 et du cancer du col de l'utérus (c.-à-d. CIN 3+) à partir d'échantillons vaginaux auto-prélevés par cytobrosse ont été évaluées en testant 247 prélèvements vaginaux positifs au HPV à haut risque. Pour 14 échantillons (5,7 %), les valeurs de C_T étaient $> 26,4$ pour l'ACTB et ont été marquées comme non valides. Les échantillons avec des résultats de test valides comprenaient 148 échantillons collectés à l'aide d'une brosse provenant de femmes avec \leq CIN 1 après 18 mois de suivi, 24 échantillons avec CIN 2, 50 avec CIN 3, 8 avec carcinome épidermoïde et 3 avec adénocarcinome. L'ADN a été extrait des prélèvements vaginaux et 250 ng d'ADN ont été utilisés pour la réaction de conversion au bisulfite (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Sur les 250 ng d'ADN converti au bisulfite, 20 % ont été utilisés dans la PCR (ce qui correspondait à 50 ng de l'ADN cible d'origine/PCR). Les taux de positivité du QIASure Methylation Test stratifiés par critère clinique sont indiqués ci-dessous (Tableau 6).

Tableau 6. Taux de positivité du QIASure Methylation Test sur des échantillons vaginaux auto-prélevés par cytobrosse

Critère clinique	Fraction	Taux de positivité (IC 95 %)
\leq CIN 1	34/148	23,0 % (16,9-30,4)
CIN 2	7/24	29,2 % (14,6-49,8)
CIN 3	33/50	66,0 % (52,0-77,7)
Carcinome épidermoïde	8/8	100,0 % (63,1-100,0)
Adénocarcinome	3/3	100,0 % (29,2-100,0)

Parmi les échantillons vaginaux auto-prélevés par cytobrosse positifs au HPV à haut risque, la sensibilité pour CIN 3+ était de 72,1 % (44/61 ; IC 95 % : 59,7-81,9) et de 100 % pour le carcinome (11/11, IC 95 % : 72-100).*

* Remarque : l'hyperméthylation des cibles dans les échantillons de femmes avec des lésions CIN avancées et/ou un cancer du col de l'utérus peut demeurer indétectable à cause de la variabilité de l'échantillonnage, par exemple suite à un échantillonnage inapproprié.

Performances de *FAM19A4* et *hsa-mir124-2* pour la détection des lésions CIN transformantes avancées

L'analyse de la méthylation du promoteur de la cellule hôte détecte spécifiquement les lésions CIN dites « avancées », qui présentent un profil de méthylation de type cancer et un risque élevé à court terme d'évolution vers un cancer (7, 8). Les performances de l'analyse de l'hyperméthylation de promoteur de *FAM19A4* et *hsa-mir124-2* ont été évaluées en testant 29 prélèvements positifs au HPV à haut risque provenant de femmes avec CIN 2/3 transformantes avancées, ainsi que 19 prélèvements positifs au HPV provenant de femmes avec CIN 2/3 transformantes précoces. La méthylation a été particulièrement associée avec les stades avancés, marquant toutes les lésions CIN 2/3 avancées (100 % ; 29/29 ; IC 95 % : 88–100) positifs à l'hyperméthylation, par rapport à 47 % (9/19 ; IC 95 % : 27–69) des lésions CIN 2/3 précoces.

Fiabilité

La fiabilité du QIAsure Methylation Test a été déterminée en évaluant la concordance entre le résultat du QIAsure Methylation Test et celui de la version du dosage qui est uniquement destinée à la recherche (research use only, RUO). Les tests ont été effectués sur de l'ADN génomique traité au bisulfite provenant de 10 échantillons cervicaux positifs au HPV à haut risque, parmi lesquels 5 échantillons avaient été identifiés comme négatifs à l'hyperméthylation pour les deux marqueurs et 5 échantillons étaient positifs à la méthylation (p. ex. pour au moins l'un des 2 marqueurs). Les tests ont été effectués en duplicat dans 8 analyses effectuées par quatre opérateurs différents (une analyse par opérateur et par jour) à l'aide de deux lots différents et de trois appareils Rotor-Gene Q MDx différents dans deux laboratoires différents. Au total, 16 points de données ont été obtenus pour chaque échantillon (Tableau 7).

Tableau 7. Concordance entre le QIAware Methylation Test et la version RUO du dosage

Numéro d'échantillon	Résultat de la version RUO	Concordance pour le 1 ^{er} laboratoire par rapport à la version RUO	Concordance pour le 2 ^o laboratoire par rapport à la version RUO
1	Nég.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
2	Nég.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
3	Nég.	62,5 % (5/8)	62,5 % (5/8)
4	Nég.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
5	Nég.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
Sous-total		92,5 % (37/40)	92,5 % (37/40)
6	Pos.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
7	Pos.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
8	Pos.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
9	Pos.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
10	Pos.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
Sous-total		100 % (40/40)	100 % (40/40)

Quatre des cinq échantillons qui avaient été préalablement identifiés comme négatifs à la méthylation ont démontré une concordance de 100 % pour le QIAware Methylation Test dans les deux laboratoires. L'échantillon 3 avait une concordance de 62,5 % (5/8) dans les deux laboratoires. La variation observée était liée à *FAM19A4* avec des niveaux avoisinant le seuil du dosage. La concordance globale entre les échantillons négatifs à la méthylation était de 92,5 % (37/40).

Les 5 échantillons qui avaient été préalablement identifiés comme positifs à la méthylation ont démontré une concordance de 100 % avec le dosage de référence, soit une concordance globale de 100 % (40/40).

Conversion au bisulfite directement sur un échantillon cervical

Le protocole « conversion au bisulfite directement sur un échantillon cervical avec l'EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit » a été contrôlé par rapport au protocole de référence (c.-à-d. conversion au bisulfite après contrôle de la quantité d'ADN de l'échantillon) sur 119 frottis cervicaux suivis du QIAsure Methylation Test. Le taux de réussite pour la conversion au bisulfite directement sur les échantillons cervicaux avec une quantité de 2,5 % d'échantillon cervical était de 95,8 % (114/119) et il a augmenté jusqu'à 100 % après la répétition des tests non valides avec une quantité de 10 % d'échantillon cervical. La concordance pour le résultat du QIAsure Methylation Test entre les protocoles de conversion au bisulfite était de 90,8 % (108/119 ; valeur kappa de 0,75).

Le protocole « conversion au bisulfite directement sur un échantillon cervical avec le QIAasympathy Bisulfite Kit » a été contrôlé par rapport au protocole de référence (c.-à-d. conversion au bisulfite après contrôle de la quantité d'ADN de l'échantillon) sur 120 frottis cervicaux suivis du QIAsure Methylation Test. Le taux de réussite pour la conversion au bisulfite directement sur les échantillons cervicaux avec une quantité de 2,5 % d'échantillon cervical était de 94,2 % (113/120) contre 97,5 % (117/120) avec le protocole de référence. La concordance pour le résultat du QIAsure Methylation Test entre les protocoles de conversion au bisulfite était de 94,7 % (107/113 ; valeur kappa de 0,88).

Références

1. Costello, J.F., and Plass, C. (2001) Methylation matters. *J. Med. Genet.* 38, 285–303.
2. Wilting, S.M., et al. (2010) Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of hsa-mir124 in cervical cancer. *Mol. Cancer* 9, 167.
3. De Strooper, L.M., et al., (2014) Methylation analysis of the FAM19A4 gene in cervical scrapes is highly efficient in detecting cervical carcinomas and advanced CIN2/3 lesions. *Cancer Prev. Res.* 7, 1251–7.
4. De Strooper, L.M., et al. (2014) CADM1, MAL and mir124-2 methylation analysis in cervical scrapes to detect cervical and endometrial cancer. *J. Clin. Pathol.* 67, 1067–71.
5. De Strooper, L.M., et al. (2016) Comparing the performance of FAM19A4 methylation analysis, cytology and HPV 16/18 genotyping for the detection of cervical (pre)cancer in high-risk HPV-positive women of a gynecologic outpatient population (COMETH study). *Int. J. Cancer* 138, 992–1002.
6. De Strooper, L.M., et al. (2016) Validation of the FAM19A4/mir124-2 DNA methylation test for both lavage- and brush-based self-samples to detect cervical (pre)cancer in HPV-positive women. *Gynecol. Oncol.* 141, 341–7.
7. Bierkens, M. et al. (2013) CADM1 and MAL promoter methylation levels in hrHPV-positive cervical scrapes increase proportional to degree and duration of underlying cervical disease. *Int. J. Cancer* 133, 1293–9.
8. Steenbergen, R.D.M. et al. (2014) Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced precancerous lesions. *Nat. Rev. Cancer* 14, 395–405.
9. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻Delta Delta C(T) Method. *Methods* 25, 402–8.
10. De Strooper, L.M., et al. (2018) Cervical cancer risk in HPV-positive women after a negative FAM19A4/miR124-2 methylation test: A post hoc analysis in the POBASCAM trial with 14 year follow-up. *Int. J. Cancer* 143, 1541–1548.

11. Vink, F.J. et al. (2020). FAM19A4/miR124-2 methylation in invasive cervical cancer: A retrospective cross-sectional worldwide study. *Int J Cancer.* 147, 1215-1221.
- Kremer, W.W. et al. (2022). Clinical Regression of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Is Associated With Absence of FAM19A4/miR124-2 DNA Methylation (CONCERVE Study). *J. Clin. Oncol.* doi: 10.1200/JCO.21.02433
12. Bonde, J. et al. (2020). Methylation markers FAM19A4 and miR124-2 as triage strategy for primary human papillomavirus screen positive women: A large European multicenter study. *Int J Cancer.* 1-1014.
13. Vink et al, IJC , 2021 - Classification of high-grade cervical intraepithelial neoplasia by p16ink4a, Ki-67, HPV E4 and FAM19A4/miR124-2 methylation status demonstrates considerable heterogeneity with potential consequences for management

Symboles

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l'emballage et les étiquettes :

Symbol	Définition du symbole
	À utiliser avant
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Symbole de la certification CE-IVD
	Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Référence produit
	Composants
	Contient
	Nombre
Rn	R désigne une révision du mode d'emploi (manuel) et n représente le numéro de révision
	Code article international
	Limite de température
	Fabricant
	Conserver à l'abri de la lumière



Consulter le mode d'emploi



Attention

Coordonnées

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

Informations pour commander

Produit	Table des matières	n° de réf.
QIASure Methylation Test Kit	Pour 72 réactions : 2 Master Mixes, 2 calibrateurs	616014
QIAsymphony SP	Module de préparation d'échantillons QIAsymphony ; garantie de 1 an pièces et main-d'œuvre (facultatif pour une extraction automatisée)	9001297
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Thermocycleur pour real-time PCR et analyseur de fusion à haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation comprises	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Thermocycleur pour real-time PCR et analyseur de fusion à haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation non comprises	9002032

Produit	Table des matières	n° de réf.
Accessoires du Rotor-Gene Q MDx		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Bloc en aluminium pour préparation manuelle des réactions à l'aide d'une pipette monocanal dans 72 tubes de 0,1 mL	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 barrettes de 4 tubes et bouchons pour 1 000 réactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1mL (2500)	10 x 250 barrettes de 4 tubes et bouchons pour 10 000 réactions	981106
Rotor-Gene AssayManager : pour les analyses de routine avec les appareils Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene AssayManager	Logiciel pour les analyses de routine en combinaison avec les appareils Rotor-Gene Q et QIAsymphony RGQ ; licence pour un seul logiciel à installer sur un seul ordinateur	9022739

Pour connaître les dernières informations sur les licences et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consulter 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.

Page laissée volontairement vierge.

Historique des révisions du document

Date	Changements
R4, juin 2019	Révision du schéma des étapes de la procédure dans « Principe et procédure » ; addition d'EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit dans « Matériel nécessaire, mais non fourni » ; révision des informations de sécurité ; addition d'informations pour le préchauffage du RGQ MDx 5-plex HRM ; révision de la section « Préparation des échantillons » ; addition d'un élément de résolution de problèmes ; addition de la Conversion au bisulfite directement sur des échantillons cervicaux dans les « Caractéristiques de performances » ; réactualisation de la section « Références » ; réactualisation de la mise en page
R5, juillet 2023	Ajout de l'appareil QIAAsymphony pour l'automatisation facultative de l'extraction et de QIAAsymphony Bisulfite Kit dans la section Matériel nécessaire, mais non fourni ; révision de la section Préparation des échantillons ; ajout de l'utilisation du milieu de prélèvement SurePath ; révision de la section Performances cliniques. Ajout d'en-têtes pour le Tableau 5 et le Tableau 6.

Accord de licence limité pour QIAsure Methylation Test

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

1. Le produit ne doit être utilisé qu'avec les composants fournis à l'intérieur du kit et conformément à ce manuel et aux protocoles fournis. 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 pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tierces parties.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne portent pas atteinte aux 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 ce contrat de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrir tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas de procédure en application de ce contrat 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.

Self-screen B.V. est le fabricant légal du QIAsure Methylation Test.

Le QIAsure Methylation Test est fabriqué par Self-screen B.V. et distribué par QIAGEN en Europe.

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAAsymphony®, digene®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (groupe QIAGEN) ; BD®, SurePath® (Becton Dickinson) ; EZ DNA Methylation™ (Zymo Research Corp.) ; NanoDrop® (NanoDrop Technologies LLC) ; PreservCyt® (Hologic, Inc.) ; Qubit® (Molecular Probes, Inc.). Les noms déposés, marques de commerce, etc. cités dans ce document doivent être considérés comme protégés par la loi, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels.

07-2023 HB-2304-005 1132288 © 2023 QIAGEN, tous droits réservés.

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