

Janvier 2019

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



Version 2



Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*

À utiliser avec les instruments Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx



874111



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



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,  
40724 Hilden, ALLEMAGNE



1116287FR



# Contenu

Utilisation prévue .....	6
Résumé et explication.....	7
Principe de la procédure .....	9
Matériel fourni.....	14
Contenu du kit.....	14
Matériel nécessaire, mais non fourni .....	15
Avertissements et précautions .....	17
Précautions générales .....	17
Stockage et manipulation des réactifs.....	19
Conditions d'expédition .....	19
Conditions de stockage.....	19
Stockage et manipulation des échantillons .....	20
Procédure .....	21
Extraction et préparation de l'ADN.....	21
Protocole : Évaluation de l'échantillon .....	22
Protocole : Détection des mutations EGFR .....	36
Interprétation des résultats (automatisée) .....	49
Messages du logiciel Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package .....	50
Guide de dépannage.....	56
Contrôle qualité.....	57
Limitations.....	57
Caractéristiques de performances.....	58

Performances analytiques .....	58
Limite du blanc (LOB), intervalle de fonctionnement et valeurs seuil.....	58
Effet du niveau d'entrée d'ADN sur les valeurs $\Delta C_T$ .....	59
Réactivité croisée.....	60
Exactitude : comparaison avec la méthode de référence analytique .....	60
Valeurs de limite de détection (LOD) .....	61
Interférence.....	63
Reproductibilité .....	63
Performances cliniques .....	66
Résultats cliniques : GIOTRIF® .....	66
Résultats cliniques : IRESSA® .....	68
Références .....	71
Symboles .....	73
Annexe A : Protocole manuel du kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR .....	74
Informations générales .....	74
Protocole : Création d'un profil de température .....	74
Procédure (manuelle).....	85
Protocole : Évaluation de l'échantillon (manuelle) .....	85
Protocole : Détection des mutations EGFR (manuelle) .....	85
Protocole : Configuration Rotor-Gene Q du kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR .....	86
Interprétation des résultats (manuelle) .....	91
Paramètres d'analyse du logiciel .....	91
Analyse des données d'évaluation de l'échantillon .....	92
Analyse des données de détection des mutations EGFR.....	94

---

Annexe B : Installation du logiciel <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package .....	103
Coordonnées .....	106
Pour commander .....	107
Historique des révisions du manuel .....	109

---

# Utilisation prévue

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR est un test de diagnostic *in vitro* destiné à détecter 29 mutations somatiques du gène EGFR. Il fournit une évaluation qualitative de l'état mutationnel d'échantillons tumoraux prélevés sur des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC).

Les résultats doivent aider le médecin à identifier les patients atteints de CPNPC pouvant bénéficier d'un traitement à base d'inhibiteurs de tyrosine-kinase de l'EGFR.

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR teste les échantillons d'ADN extraits de tissu tumoral fixé au formaldéhyde et inclus en paraffine (formalin-fixed, paraffin embedded, FFPE) prélevés sur des patients atteints de CPNPC et fonctionne sur un instrument Rotor-Gene Q MDx. Il doit être utilisé par un personnel formé, dans un environnement professionnel de laboratoire.

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

# Résumé et explication

Les mutations de l'oncogène EGFR apparaissent dans les cancers humains (1, 2). La présence de ces mutations est mise en corrélation avec une réponse à certains traitements à base d'inhibiteurs de tyrosine-kinase (ITK) chez les patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) (3–8). Dans une population générale de patients atteints de CPNPC, de telles mutations de l'oncogène EGFR sont présentes chez environ 10 % des patients aux États-Unis, en Europe ou en Australie et jusqu'à 30 % des patients au Japon et à Taiwan (1, 2, 9).

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

Grâce aux technologies Scorpions® (10) et ARMS (système de mutation réfractaire par amplification) (11), le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR permet de détecter, dans un bruit de fond d'ADN génomique de type sauvage, 29 mutations dans les exons 18, 19, 20 et 21 de l'oncogène EGFR (tableau 1). En résumé,

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

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

**Tableau 1. Liste des mutations et des identifiants COSMIC**

Exon	Mutation	ID COSMIC*	Changement de base
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	Délétions	12384	2237_2255>T
		12387	2239_2258>CA
		12419	2238_2252>GCA
		12422	2238_2248>GC
		13551	2235_2252>AAT
		12678	2237_2251del15
		6218	2239_2247del9
		12728	2236_2253del18
		12367	2237_2254del18
		6210	2240_2251del12
		6220	2238_2255del18
		6223	2235_2249del15
		6225	2236_2250del15
		6254	2239_2253del15
		6255	2239_2256del18
		12369	2240_2254del15
		12370	2240_2257del18
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C
		12383	2239_2251>C

\* COSMIC : Catalogue of somatic mutations in cancer (catalogue des mutations somatiques associées au cancer) : <http://cancer.sanger.ac.uk/>.



**Tableau 1. Suite Liste des mutations et des identifiants COSMIC**

Exon	Mutation	ID COSMIC*	Changement de base
20	S768I	6241	2303G>T
	Insertions	12376	2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	2310_2311insGGT
		12377	2319_2320insCAC
	T790M	6240	2369C>T
21	L858R	6224	2573T>G
	L861Q	6213	2582T>A

\* COSMIC : Catalogue of somatic mutations in cancer (catalogue des mutations somatiques associées au cancer) : <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

## Principe de la procédure

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR est composé de huit mélanges réactionnels distincts pour amplification par PCR : sept réactions spécifiques à la mutation dans les exons 18, 19, 20 et 21 de l'oncogène EGFR, et un contrôle de type sauvage dans l'exon 2. Les principaux composants du kit sont détaillés ci-dessous.

### ARMS

L'amplification spécifique d'allèle ou de mutation s'effectue par le biais du système ARMS (système de mutation réfractaire par amplification). La *Taq* ADN polymérase (*Taq*) permet d'établir une distinction efficace entre un appariement et un mésappariement à l'extrémité 3' d'une amorce de PCR. Des séquences aux mutations spécifiques sont sélectionnées pour être amplifiées, même dans des échantillons où la majorité des séquences ne porte pas la mutation. Lorsque l'amorce est entièrement appariée, l'efficacité de l'amplification est maximale. Lorsque la base 3' est mésappariée, seule une amplification de faible bruit de fond se produit.

## Scorpions

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

## Format du kit

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

- Un test de contrôle (CTRL)
- Sept tests de mutation

Tous les mélanges réactionnels contiennent des réactifs destinés à détecter les cibles marquées par la carboxyfluorescéine (FAM™) et un test de contrôle interne marqué par l'hexachlorofluorescéine (HEX™). La présence d'inhibiteurs pouvant entraîner des faux négatifs peut ainsi être détectée par le test de contrôle interne. L'amplification FAM peut surpasser l'amplification par contrôle interne, dont le but est simplement de montrer qu'en l'absence d'amplification FAM, le résultat est un vrai négatif et non un échec de la PCR.

## Tests

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

## Test de contrôle

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

## Tests de mutation

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

## Contrôles

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

### Contrôle positif

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

### Contrôle négatif

Chaque analyse doit contenir un contrôle négatif (« no template control » : NTC) dans les tubes 9 à 16. Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR contient de l'eau pour le NTC à utiliser en tant que « matrice » pour le contrôle négatif. Le contrôle négatif est utilisé pour évaluer toute contamination potentielle durant la configuration de l'analyse et pour évaluer les performances de la réaction du contrôle interne.

## Évaluation de la réaction du contrôle interne

Chaque mélange réactionnel contient un contrôle interne (internal control, IC) en plus de la réaction cible. Un échec indique la présence éventuelle d'inhibiteurs susceptibles d'entraîner un résultat inexact ou la survenue d'une erreur de configuration de l'opérateur pour ce tube. L'IC utilise une séquence cible d'oligonucléotides non liés au gène EGFR, une amorce non marquée et une amorce Scorpions marquée avec HEX afin de la distinguer des amorces Scorpions marquées FAM dans les mélanges réactionnels de contrôle et de mutation. L'amplification FAM peut surpasser l'amplification par IC, de sorte que la valeur  $C_T$  de l'IC (HEX) peut se trouver en dehors de l'intervalle spécifié. Les résultats FAM demeurent valides pour ces échantillons.

## Évaluation de l'échantillon

Il est vivement recommandé d'utiliser le mélange réactionnel de contrôle (tube CTRL) fourni avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR pour évaluer l'ADN amplifiable total d'EGFR présent dans un échantillon. Ce test de contrôle amplifie une région de l'exon 2 du gène EGFR. Il est recommandé de préparer les échantillons uniquement avec le test de contrôle, en utilisant le PC EGFR comme contrôle positif et de l'eau pour la matrice comme contrôle négatif.

**Remarque :** l'évaluation de l'ADN doit être basée sur la PCR et peut différer de la quantification basée sur les valeurs d'absorbance. Un mélange réactionnel de contrôle supplémentaire (tube CTRL) est fourni pour évaluer la qualité et la quantité d'ADN dans les échantillons avant l'analyse avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

## Plate-forme et logiciel

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR est spécialement conçu pour une utilisation avec les instruments Rotor-Gene Q MDx. L'instrument Rotor-Gene Q MDx est programmé pour différents paramètres de cycle, ou « analyses », par le logiciel *therascreen* EGFR CE Assay Package.

---

Le logiciel *therascreen* EGFR CE Assay Package se compose de deux modèles : « *therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template » (pour l'évaluation des échantillons d'ADN) et « *therascreen* EGFR CE Locked Template » (pour la détection des mutations EGFR). Ces modèles contiennent les paramètres d'analyse par PCR et calculent les résultats.

Il est aussi possible d'utiliser le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR avec le logiciel Rotor-Gene Q series version 2.3 en mode ouvert (sans utiliser le logiciel Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package). Pour plus d'informations, voir « Annexe A : *Protocole* manuel du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR », page 74.

# Matériel fourni

## Contenu du kit

<b>therascreen EGFR RGQ PCR Kit</b>				<b>(24)</b>
<b>N° de référence</b>				<b>874111</b>
<b>Nombre de réactions</b>				<b>24</b>
<b>Couleur</b>	<b>Désignation</b>	<b>Identifiant du tube</b>		<b>Volume</b>
Rouge	Control Reaction Mix (mélange réactionnel de contrôle)	1	CTRL	2 × 600 µl
Violet	T790M Reaction Mix (mélange réactionnel T790M)	2	T790M	600 µl
Orange	Deletions Reaction Mix (mélange réactionnel délétions)	3	Del	600 µl
Rose	L858R Reaction Mix (mélange réactionnel L858R)	4	L858R	600 µl
Vert	L861Q Reaction Mix (mélange réactionnel L861Q)	5	L861Q	600 µl
Jaune	G719X Reaction Mix (mélange réactionnel G719X)	6	G719X	600 µl
Gris	S768I Reaction Mix (mélange réactionnel S768I)	7	S768I	600 µl
Bleu	Insertions Reaction Mix (mélange réactionnel insertions)	8	Ins	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (contrôle positif EGFR)	9	PC	300 µl
Menthe	Taq DNA Polymerase (Taq ADN polymérase)	Taq	2 × 80 µl	2 × 80 µl
Blanc	Nuclease-free water for No Template Control (eau sans nucléase pour NTC)	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Blanc	Nuclease-free water for Dilution (eau sans nucléase pour dilution)	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook (Manuel du kit therascreen EGFR RGQ PCR)				1

# Matériel nécessaire, mais non fourni

Lors de la 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.

## Réactifs

- Kit d'extraction d'ADN (voir « Extraction et préparation de l'ADN », page 21)

## Consommables et équipement général de laboratoire

- Pipettes dédiées\* (adaptables) pour la préparation des échantillons
- Pipettes dédiées\* (adaptables) pour la préparation du master mix PCR
- Pipettes dédiées\* (adaptables) pour la distribution de l'ADN matrice
- Pointes de pipette exemptes de DNase, de RNase et d'ADN avec filtres (pour éviter la contamination croisée, les pointes de pipette avec des filtres anti-aérosols sont recommandées)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (rangées de tubes et de bouchons), pour utilisation avec un rotor à 72 puits (référence 981103 ou 981106)
- Tubes de microcentrifugeuse exemptes de DNase, de RNase et d'ADN pour la préparation des master mix
- Loading Block 72 x 0.1 ml (Bloc de chargement de tubes de 72 x 0,1 ml): bloc en aluminium pour préparation de réaction manuelle avec pipette à canal unique (n° réf. 9018901)
- Thermomixeur\*, incubateur orbital chauffé\*, bloc chauffant\* ou bain-marie\* capable d'incuber à 90 °C

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

- Centrifugeuse de paillasse\* avec rotor pour tubes de réaction de 2ml
- Agitateur Vortex\*

## Équipement pour PCR

- Instrument Rotor-Gene Q MDx avec canaux de fluorescence pour Cycling Green et Cycling Yellow (pour détecter FAM et HEX, respectivement)\*†
- Logiciel Rotor-Gene Q de version 2.3
- CD de Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package version 3.0.5 (n° de réf. 9023537)

**Remarque** : le logiciel Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package requiert le logiciel Rotor-Gene Q series version 2.3.

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

† Dans certains pays, le cas échéant, il est possible d'utiliser l'instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM avec, comme date de production, mai 2011 ou une date ultérieure. La date de production peut être obtenue à partir du numéro de série à l'arrière de l'instrument. Le numéro de série présente le format « mmaannn », où « mm » désigne le mois de production en chiffres, « aa » les deux derniers chiffres de l'année de production et « nnn » l'identifiant d'instrument unique.



# Avertissements et précautions

## Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*

Lors de la 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.

Pour des informations de sécurité concernant l'instrument Rotor-Gene Q, consulter le manuel d'utilisation fourni avec l'instrument.

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

## Précautions générales

Toujours faire attention aux éléments suivants :

- Le test est destiné à une utilisation avec des échantillons de tissu FFPE de CPNPC.
- Conserver et extraire le matériel positif (échantillons et contrôles positifs) séparément de tous les autres réactifs puis l'ajouter au mélange réactionnel dans un emplacement suffisamment distant.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination des PCR avec le matériel de contrôle synthétique. Nous recommandons d'utiliser des pipettes séparées et dédiées pour préparer les mélanges réactionnels et ajouter l'ADN matrice. La préparation et la distribution des mélanges réactionnels doivent être effectuées dans une zone séparée de celle de l'ajout de l'ADN matrice. Les tubes du Rotor-Gene Q ne doivent pas être ouverts une fois l'analyse PCR terminée. Cela permet d'éviter toute contamination de laboratoire avec les produits ultérieurs à la PCR.

- Tous les produits chimiques et biologiques sont potentiellement dangereux. Les prélèvements et échantillons présentent un risque potentiel d'infection et doivent être traités comme du matériel présentant un risque biologique.
- Les réactifs pour le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR ont été dilués de manière optimale. Ne pas effectuer de dilution supplémentaire des réactifs : celle-ci pourrait entraîner une baisse des performances. Ne pas utiliser de volumes réactionnels (mélange réactionnel plus échantillon) inférieurs à 25 µl compte tenu du risque accru de faux négatifs.
- Tous les réactifs fournis dans le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans le même kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Ne pas remplacer les réactifs du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR ou entre les kits *therascreen* EGFR RGQ PCR, au risque d'en affecter les performances.
- Utiliser uniquement la *Taq* ADN polymérase (tube *Taq*) fournie dans le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Ne pas la remplacer par de la *Taq* ADN polymérase d'autres kits du même type ou de type différent ni par de la *Taq* ADN polymérase d'un autre fournisseur.
- Ne pas utiliser de composants périmés ou mal conservés.

**Remarque** : faire preuve de prudence pour garantir un test correct des échantillons. Une attention toute particulière doit être accordée aux mauvaises entrées d'échantillons ainsi qu'aux erreurs de chargement ou de pipetage.

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

# Stockage et manipulation des réactifs

## Conditions d'expédition

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

## Conditions de stockage

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR doit être stocké dès réception à une température comprise entre -30 °C et -15 °C dans un congélateur à température constante et à l'abri de la lumière. Les molécules Scorpions (comme toutes les molécules marquées en fluorescence) doivent être protégées de la lumière pour éviter tout photoblanchiment ou toute perte de performances. Le kit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'il est stocké conformément aux conditions de conservation recommandées dans son emballage original. Éviter les congélations et décongélations à répétition. Ne pas dépasser un maximum de huit cycles de congélation/décongélation.

Les réactifs doivent être décongelés à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 1 à 4,5 heures. Lorsque les réactifs sont prêts à l'emploi, les réactions PCR peuvent être préparées et les tubes Rotor-Gene Q contenant les master mix ainsi que l'échantillon d'ADN doivent être chargés immédiatement sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx. La durée totale, depuis le début de la préparation de la PCR jusqu'au démarrage de l'analyse, ne doit pas dépasser :

- 6 heures en cas de conservation à température ambiante

**Remarque :** cette durée inclut la préparation et le stockage de la PCR.

- 18 heures en cas de conservation au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C)

**Remarque** : cette durée inclut la préparation et le stockage de la PCR.

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

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

## Stockage et manipulation des échantillons

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

Les échantillons doivent être constitués d'ADN génomique humain extrait de tissu FFPE. Les échantillons doivent être transportés conformément à la méthodologie standard de pathologie pour garantir leur bonne qualité.

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

Pour préparer des échantillons de tissu à l'extraction d'ADN :

- À l'aide de méthodes et de matériel standard, fixer le prélèvement de tissu à 10 % de formaldéhyde neutre tamponné et l'inclure en paraffine. À l'aide d'un microtome, faire des coupes sériées de 5 µm dans le bloc de paraffine et les placer sur des lames en verre.
- Solliciter un professionnel expérimenté (par ex. un pathologiste) pour évaluer une coupe colorée à l'hématoxyline-éosine afin de confirmer la présence d'une tumeur.
- Les coupes colorées ne doivent pas être utilisées pour l'extraction d'ADN.
- Conserver tous les blocs et toutes les lames FFPE à température ambiante (de 15 à 25 °C). Les lames peuvent être conservées à température ambiante jusqu'à 1 mois avant l'extraction d'ADN.

## Procédure

### Extraction et préparation de l'ADN

Les caractéristiques de performances de ce kit ont été déterminées à l'aide d'ADN extrait avec le kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (n° réf. 60404). S'il est disponible dans votre pays, ce kit doit être utilisé pour la préparation de l'ADN. En cas d'utilisation du kit QIAamp DNA FFPE Tissue (n° réf. 56404) aux fonctions équivalentes, procéder à l'extraction de l'ADN conformément aux instructions du manuel **en prenant en compte les remarques suivantes** :

- Ne pas utiliser la solution de déparaffinisation QIAGEN. Pour la déparaffinisation, utiliser uniquement la méthode au xylène ou à l'éthanol décrite dans le *manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook)*.
- S'assurer d'utiliser de l'éthanol de qualité biologie moléculaire\* pour toutes les étapes requises.

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

- Gratter toute la zone de tissu de deux coupes et la placer dans un tube de microcentrifugeuse marqué. Utiliser un nouveau scalpel pour chaque échantillon.
- La digestion de la protéinase K (étape 11 du *manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue*) doit être effectuée pendant 1 heure  $\pm$  5 minutes à  $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- La digestion de la protéinase K (étape 12 du *manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue*) doit être effectuée pendant 1 heure  $\pm$  5 minutes à  $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Ne pas effectuer l'étape de RNase décrite dans le *manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue*.
- Les échantillons doivent être élués dans 120  $\mu\text{l}$  de tampon d'éluion (ATE) du kit QIAamp DNA FFPE Tissue (étape 20 du *manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue*).
- L'ADN génomique peut être conservé à une température comprise entre 2 et  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant la semaine suivant l'extraction, ou à une température comprise entre  $-30$  et  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à 8 semaines avant utilisation.

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

## Protocole : Évaluation de l'échantillon

Ce protocole est utilisé pour évaluer l'ADN total amplifiable dans les échantillons à l'aide du modèle « *therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template » du logiciel Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package pour l'évaluation automatisée des échantillons.

**Remarque** : pour l'évaluation manuelle des échantillons d'ADN, voir « Annexe A : Protocole manuel du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR », page 74.

## Remarques importantes avant de commencer

- Avant de commencer la procédure, lire « Précautions générales », page 17.
- Prendre le temps de se familiariser avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx avant de commencer le protocole. Voir le manuel de l'utilisateur de l'instrument.
- Ne pas faire passer la *Taq* ou tout autre mélange contenant de la *Taq* dans l'agitateur : l'enzyme pourrait être désactivée.
- Pipetter la *Taq* en plaçant la pointe de la pipette juste sous la surface du liquide pour éviter le risque d'enrobage de la pointe dans une quantité excessive d'enzyme.
- Le mélange réactionnel de contrôle disponible permet d'évaluer un maximum de 24 échantillons.

## À effectuer avant de commencer

- Avant la première utilisation de l'instrument Rotor-Gene Q MDx, s'assurer que le logiciel Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package est installé (voir « Annexe B : Installation du logiciel *therascreen* EGFR CE Assay Package », page 103).
- Avant chaque utilisation, tous les réactifs doivent être mis à décongeler complètement pendant une durée comprise entre 1 heure et 4,5 heures à température ambiante (entre 15 et 25 °C), mélangés en les retournant 10 fois et passés brièvement à la centrifugeuse pour prélever le contenu au fond du tube.
- Mélanger tous les échantillons en les retournant 10 fois et les passer brièvement à la centrifugeuse pour prélever le contenu au fond du tube.
- S'assurer que la *Taq* est à température ambiante (entre 15 et 25 °C) avant chaque utilisation. Passer brièvement le tube à la centrifugeuse pour pouvoir prélever l'enzyme au fond du tube.

## Procédure

1. Décongeler le mélange réactionnel de contrôle (CTRL), l'eau sans nucléase pour le NTC et le contrôle positif (PC) EGFR à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pendant une période comprise entre 1 et 4,5 heures.

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

**Tableau 2. Durée de décongélation, durée de préparation de la PCR et températures de stockage**

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

**Remarque :** la préparation de la PCR est effectuée à température ambiante (15 à 25 °C). Le terme « stockage » désigne la durée entre l'achèvement de la préparation de la PCR et le début de l'analyse par PCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

**Remarque :** porter la *Taq* à température ambiante (15 à 25 °C) en même temps que les autres réactifs (voir « Stockage et manipulation des réactifs », page 19). Passer brièvement le tube à la centrifugeuse pour pouvoir prélever l'enzyme au fond du tube.

2. Une fois les réactifs décongelés, les mélanger en retournant chaque tube 10 fois pour éviter les concentrations locales de sels, puis les passer brièvement à la centrifugeuse pour prélever le contenu se trouvant au fond du tube.
3. Préparer suffisamment de master mix de contrôle (mélange réactionnel de contrôle [CTRL] plus *Taq*) pour les échantillons d'ADN, une réaction de PC EGFR et une réaction de NTC en respectant les volumes donnés dans le Tableau 3. Inclure des réactifs pour 1 échantillon supplémentaire pour disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR.

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



**Tableau 3. Préparation du master mix du test de contrôle**

Composant	Volume
Mélange réactionnel de contrôle (CTRL)	19,5 µl × (n + 1)*
Taq ADN polymérase (Taq)	0,5 µl × (n + 1)
<b>Volume total</b>	<b>20 µl/réaction</b>

\* n = nombre de réactions (échantillons plus contrôles). Préparer suffisamment de master mix pour 1 échantillon supplémentaire (n + 1) afin de disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR. La valeur de n ne doit pas dépasser 26 (24 échantillons, plus 2 contrôles).

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

4. Mélanger complètement le master mix en pipettant doucement l'ensemble 10 fois. Placer le nombre approprié de tubes en barrettes dans le bloc de chargement conformément à la disposition du Tableau 4. Ajouter immédiatement 20 µl de master mix dans chaque tube de PCR.

Les bouchons restent dans le conteneur en plastique le temps nécessaire. Pour l'évaluation des échantillons d'ADN, le master mix du test de contrôle est ajouté à un tube PC, un tube NTC et un tube pour chaque échantillon.

**Tableau 4. Disposition des tests d'évaluation de l'échantillon d'ADN dans le bloc de chargement.** Les chiffres indiquent les positions dans le bloc de chargement et la position finale dans le rotor.

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

5. Ajouter immédiatement 5 µl d'eau pour le NTC dans le tube en position 2 et boucher le tube.
6. Ajouter 5 µl de chaque échantillon dans les tubes d'échantillon (positions de tubes 3 à 26) et boucher les tubes.
7. Ajouter 5 µl de PC EGFR dans le tube en position 1 et boucher le tube.

Prendre soin d'éviter toute erreur de chargement ou de pipetage pour s'assurer de l'ajout correct de NTC, d'échantillons et de PC dans les tubes appropriés. Marquer le couvercle des tubes pour indiquer la direction de chargement des tubes dans l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

8. Une fois tous les tubes de PCR bouchés, vérifier à l'œil nu les niveaux de remplissage des tubes d'échantillon pour garantir que l'échantillon a été ajouté dans chacun d'entre eux.
9. Retourner tous les tubes de PCR quatre fois pour mélanger les échantillons et les mélanges réactionnels.
10. Placer les tubes de PCR sur le rotor de 72 puits dans les positions correspondantes, conformément à la disposition du Tableau 4.

Si le rotor n'est pas complètement rempli, remplir les positions vides sur le rotor avec des tubes vides bouchés.

11. Placer immédiatement le rotor de 72 puits dans l'instrument Rotor-Gene Q MDx. Vérifier que la bague de fermeture (accessoire de l'instrument Rotor-Gene Q MDx) est placée au-dessus du rotor pour que les tubes ne bougent pas lors de l'analyse.

**Remarque** : en cas d'évaluation manuelle des échantillons, voir « Annexe A : *Protocole manuel du kit theascreen EGFR RGQ PCR* », page 74.

12. Lancer le logiciel Rotor-Gene Q series en double-cliquant sur l'icône « *therascreen EGFR CE Control Run Locked Template* » située sur le bureau de l'ordinateur connecté à l'instrument Rotor-Gene Q MDx (figure 1).



Figure 1. Icône EGFR CE Control Run Locked Template pour l'analyse de contrôle (évaluation de l'échantillon).

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

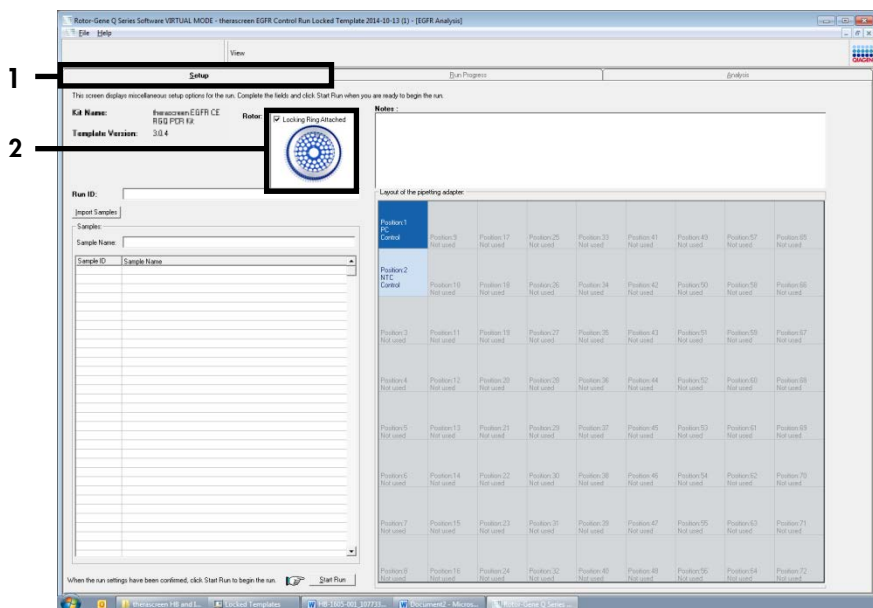


Figure 2. Onglet « Setup » (configuration) (1) et case « Locking Ring Attached » (bague de fermeture fixée) (2).

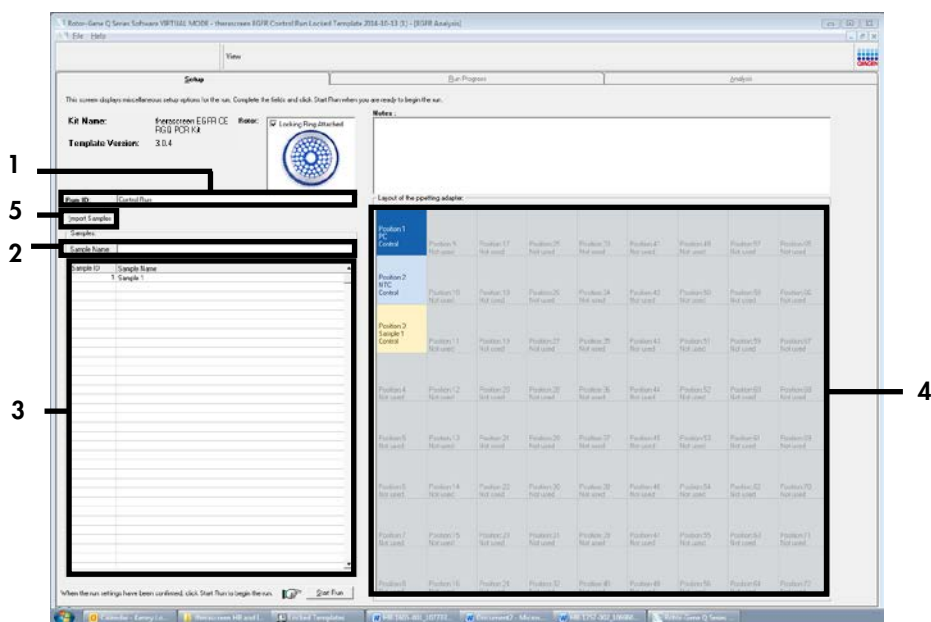
14. Entrer l'identifiant de l'analyse dans le champ « Run ID » (identifiant d'analyse) selon la nomenclature locale. Entrer le nom de l'échantillon dans le champ « Sample Name » (nom d'échantillon) selon la nomenclature locale et appuyer sur Entrée.

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

**Remarque :** il est également possible d'importer les noms d'échantillons enregistrés aux formats \*.smp (fichier échantillon Rotor-Gene Q) ou \*.csv (comma-separated values, valeurs séparées par des virgules) avec la fonction « Import Samples » (importer des échantillons). Les noms d'échantillons sont automatiquement renseignés avec cette méthode.

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

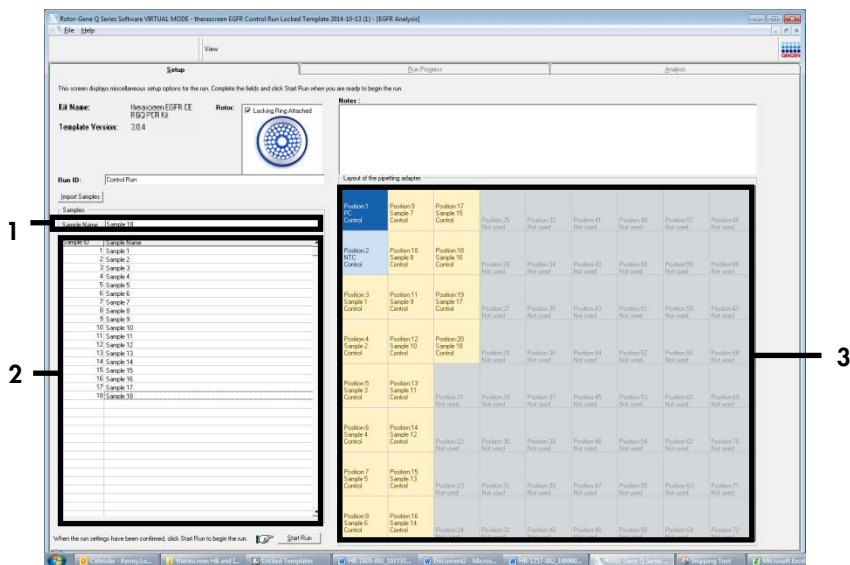
**Remarque :** les noms d'échantillons comportant plus de huit caractères peuvent ne pas s'afficher entièrement dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (agencement de l'adaptateur de pipette).



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

15. Répéter l'étape 14 pour saisir les noms de tous les échantillons supplémentaires (figure 4).

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



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

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

**Remarque :** si une position de rotor est inutilisée, la mention « Warning » (avertissement) s'affiche (figure 5) pour rappeler à l'utilisateur que toutes les positions inutilisées du rotor doivent être occupées par des tubes vides bouchés. Vérifier que toutes les positions inutilisées du rotor sont occupées par des tubes vides bouchés et cliquer sur OK pour continuer.

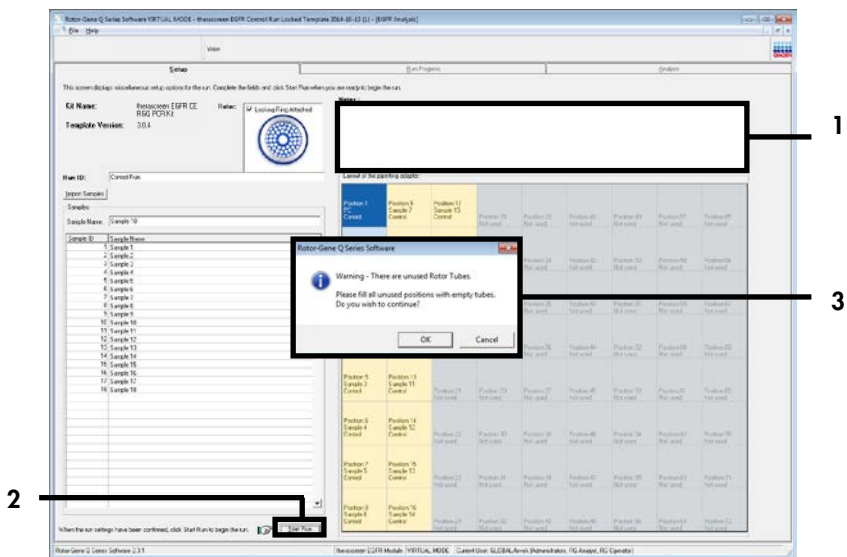
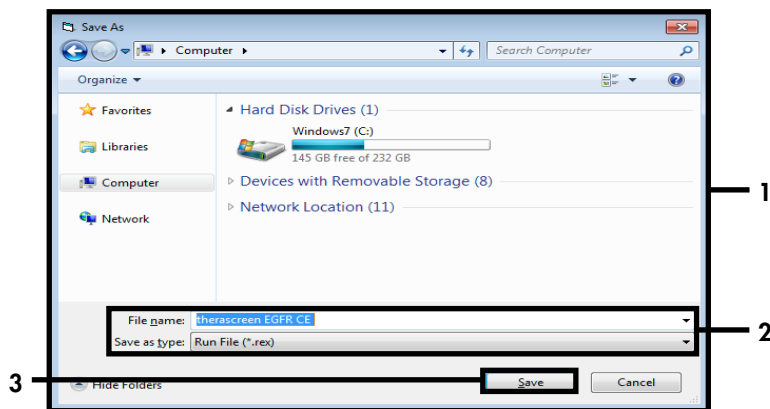


Figure 5. Champ « Notes » (1), bouton « Start Run » (démarrer l'analyse) (2) et avertissement concernant les positions de rotor inutilisées (3).

17. La fenêtre « Save As » (enregistrer sous) s'ouvre. Choisir un nom de fichier approprié et enregistrer l'analyse de PCR dans un fichier d'analyse \*.rex à l'emplacement sélectionné. Cliquer sur « Save » (enregistrer) (figure 6).

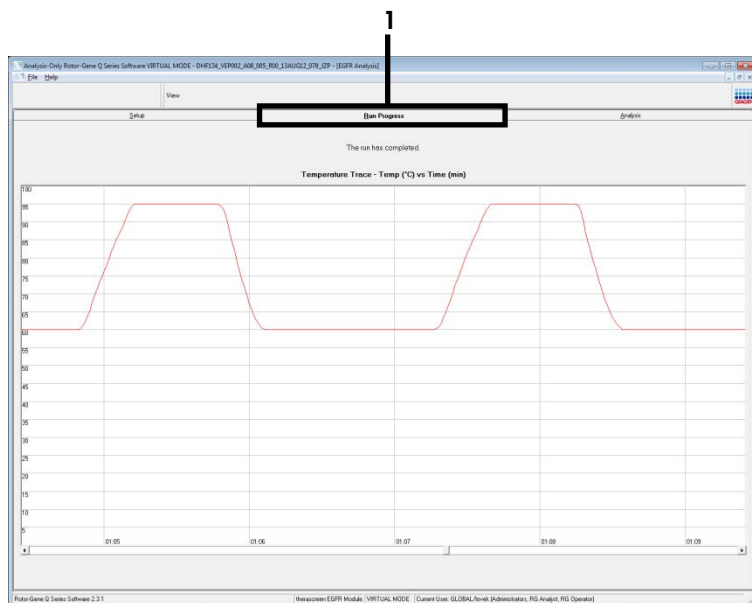


**Figure 6.** Fenêtre « Save As » (enregistrer sous) (1). 2 = champs « File name » (nom de fichier) et « Save as type » (type d'enregistrement), 3 = bouton « Save » (enregistrer).



## 18. L'analyse PCR démarre.

**Remarque :** lorsque l'analyse démarre, l'onglet « Run Progress » (progression de l'analyse) s'ouvre pour indiquer un suivi de la température et le temps restant de l'analyse (figure 7).



**Figure 7. Onglet « Run Progress » (progression de l'analyse) (1).**

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

**Remarque :** si l'onglet « Analysis » (analyse) ne s'ouvre pas, cliquer dessus (figure 8).

**Remarque :** la méthode de calcul est expliquée à la section « Interprétation des résultats (automatisée) », page 49.

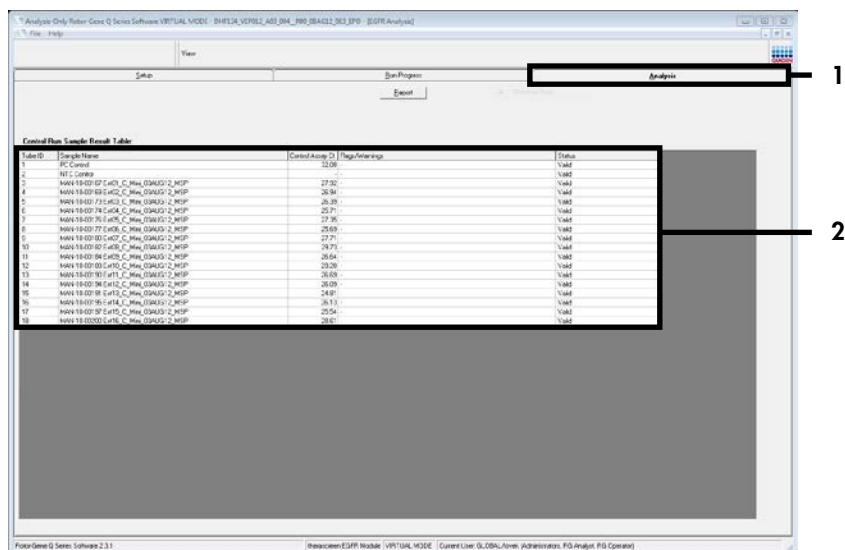


Figure 8. Onglet « Analysis » (analyse) (1) et rapport de résultats (2 = « Sample QC Result Table » (tableau des résultats de CQ d'échantillons)).

20. Les résultats de contrôle sont rapportés comme suit dans le tableau « Sample QC Result Table » (tableau des résultats de CQ d'échantillons) (figure 8).

**Contrôles d'analyse (PC et NTC, positions respectives de tube 1 et 2).** Si les résultats se trouvent dans des intervalles acceptables, ils sont affichés comme « Valid » (valides). Dans le cas contraire, la mention « Invalid » (invalide) s'affiche.

**Une valeur  $C_T$  de réaction de contrôle d'échantillon > 31,10 s'affiche comme « invalide ».**

La quantité d'ADN n'est pas suffisante pour l'analyse de la mutation. Retester l'échantillon. Si la quantité d'ADN est toujours insuffisante, extraire davantage de tissu tumoral si possible.

**Une valeur  $C_T$  de réaction de contrôle d'échantillon < 23,70 s'affiche comme invalide.**

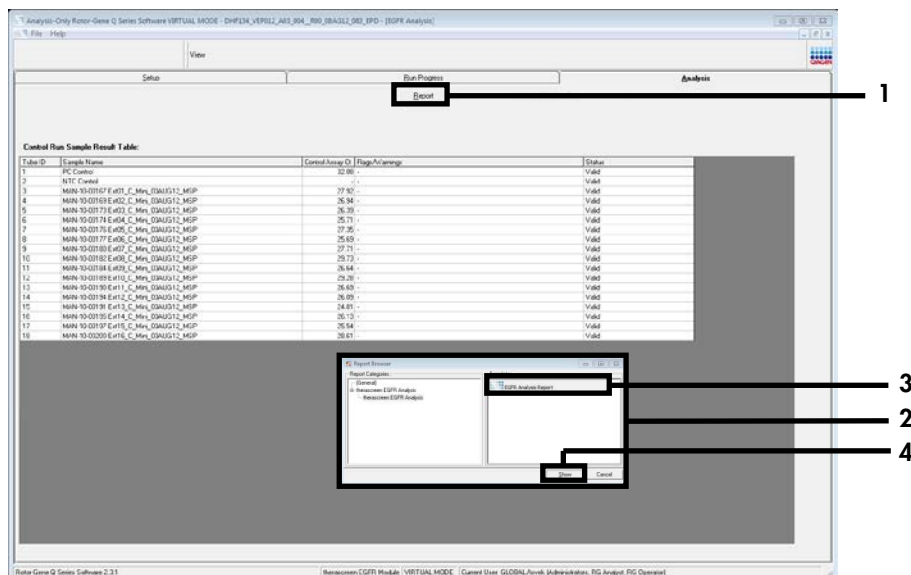
La concentration d'ADN est trop élevée pour l'analyse de la mutation. Diluer avec de l'eau sans nucléase pour dilution (Dil.) et refaire le test. Diluer pour obtenir une valeur  $C_T$  comprise entre 23,70 et 31,10. Une dilution de 1:1 augmente la valeur  $C_T$  de 1,0 approximativement.

Une valeur  $C_T$  de réaction de contrôle d'échantillon comprise entre 23,70 et 31,10 ( $23,70 \leq C_T \text{ de contrôle} \leq 31,10$ ) s'affiche comme valide. La concentration d'ADN est adaptée à l'analyse de la mutation.

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

21. Cliquer sur « Report » (rapport) pour produire un fichier de rapport. La fenêtre « Report Browser » (navigateur de rapports) s'ouvre alors. Sélectionner « EGFR CE Analysis Report » (rapport d'analyse EGFR CE) sous « Templates » (modèles) et cliquer sur « Show » (afficher) (figure 9).

**Remarque** : pour enregistrer les rapports à un autre emplacement au format archive Web, cliquer sur « Save As » (enregistrer sous) dans le coin supérieur gauche de chaque rapport.



**Figure 9.** Sélection du « EGFR CE Analysis Report » (rapport d'analyse EGFR CE). 1 = « Report » (rapport), 2 = fenêtre « Report Browser » (navigateur de rapports), 3 = sélection « EGFR Analysis Report » (rapport d'analyse EGFR), 4 = « Show » (afficher).

## Protocole : Détection des mutations EGFR

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

**Remarque** : pour la détection manuelle des mutations, voir « Annexe A : *Protocole manuel du kit theascreen EGFR RGQ PCR* », page 74.

### Remarques importantes avant de commencer

- Avant de commencer la procédure, lire « Précautions générales », page 17.
- Prendre le temps de se familiariser avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx avant de commencer le protocole. Voir le manuel de l'utilisateur de l'instrument.
- Une fois l'évaluation de l'échantillon d'ADN réussie, ce dernier peut être testé à l'aide des tests de mutations EGFR.
- Pour une utilisation efficace du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, les échantillons doivent être regroupés en lots de sept. Avec des lots plus petits, moins d'échantillons pourront être testés avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.
- Un échantillon doit être testé à l'aide de tous les mélanges réactionnels fournis dans le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.
- Ne pas faire passer la *Taq* ou tout autre mélange contenant de la *Taq* dans l'agitateur : l'enzyme pourrait être désactivée.
- Pipetter la *Taq* en plaçant avec soin la pointe de la pipette juste sous la surface du liquide pour éviter le risque d'enrobage de la pointe dans une quantité excessive d'enzyme.

## À effectuer avant de commencer

- Avant la première utilisation de l'instrument Rotor-Gene Q MDx, s'assurer que le logiciel Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package est installé (voir « Annexe B : Installation du logiciel *therascreen* EGFR CE Assay Package », page 103).
- Avant chaque utilisation, tous les réactifs doivent être mis à décongeler complètement pendant une durée comprise entre 1 heure et 4,5 heures à température ambiante (entre 15 et 25 °C), mélangés en les retournant 10 fois et passés brièvement à la centrifugeuse pour prélever le contenu au fond du tube.
- Mélanger tous les échantillons en les retournant 10 fois et les passer brièvement à la centrifugeuse pour prélever le contenu au fond du tube.
- S'assurer que la *Taq* est à température ambiante (entre 15 et 25 °C) avant chaque utilisation. Passer brièvement le tube à la centrifugeuse pour pouvoir prélever l'enzyme au fond du tube.

## Procédure

1. Décongeler tous les tubes de mélange réactionnel, l'eau pour le NTC et le PC EGFR à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pendant une période comprise entre 1 et 4,5 heures.

Les durées de décongélation des réactifs, de préparation de la PCR et de stockage avant le début de l'analyse sont indiquées dans le Tableau 5.

**Tableau 5. Durée de décongélation, durée de préparation de la PCR et températures de stockage**

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

**Remarque** : la préparation de la PCR est effectuée à température ambiante (15 à 25 °C). Le terme « stockage » désigne la durée entre l'achèvement de la préparation de la PCR et le début de l'analyse par PCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

**Remarque** : porter la *Taq* (tube *Taq*) à température ambiante (15 à 25 °C) en même temps que les autres réactifs (voir « Stockage et manipulation des réactifs », page 19). Passer brièvement le tube à la centrifugeuse pour pouvoir prélever l'enzyme au fond du tube.

2. Une fois les réactifs décongelés, les mélanger en retournant chaque tube 10 fois pour éviter les concentrations locales de sels, puis les passer brièvement à la centrifugeuse pour prélever le contenu se trouvant au fond du tube.
3. Préparer suffisamment de master mix de test (mélange réactionnel de test plus *Taq*) pour les échantillons d'ADN, un PC EGFR et une réaction de NTC en respectant les volumes donnés dans le Tableau 6. Inclure des réactifs pour 1 échantillon supplémentaire pour disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR.

Les master mix contiennent tous les composants nécessaires pour la PCR, excepté l'échantillon.

**Tableau 6. Préparation des master mix de test**

Test	Tube de mélange réactionnel	Volume de mélange réactionnel	Volume de la <i>Taq</i> ADN polymérase (tube <i>Taq</i> )
Contrôle	CTRL	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)^*$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)^*$
T790M	T790M	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
Délétions	Del	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
L858R	L858R	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
L861Q	L861Q	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
G719X	G719X	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
S768I	S768I	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
Insertions	Ins	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$

\* n = nombre de réactions (échantillons plus contrôles). Préparer suffisamment de master mix pour 1 échantillon supplémentaire (n + 1) afin de disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR. La valeur de n ne doit pas dépasser sept (plus les contrôles), sept étant le nombre maximum d'échantillons pour une analyse.

4. Mélanger complètement les master mix de test en pipettant doucement l'ensemble 10 fois. Placer le nombre approprié de tubes en barrettes dans le bloc de chargement conformément à la disposition du Tableau 7. Ajouter immédiatement 20 µl du master mix approprié dans chaque tube de PCR.

Les bouchons restent dans le conteneur en plastique le temps nécessaire.

**Tableau 7. Disposition des tests de contrôle et de mutation dans le bloc de chargement.** Les chiffres indiquent les positions dans le bloc de chargement et la position finale dans le rotor.

Test	Contrôles		Position						
	PC	NTC	1	2	3	Numéro de l'échantillon 4	5	6	7
Contrôle	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Délétions	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Insertions	8	16	24	32	40	48	56	64	72

5. Ajouter immédiatement 5 µl d'eau pour le NTC dans les tubes aux positions 9 à 16 et boucher les tubes.
6. Ajouter 5 µl de chaque échantillon aux tubes d'échantillon (positions de tube n° 17 à 24, 25 à 32, 33 à 40, 41 à 48, 49 à 56, 57 à 64 et 65 à 72) et boucher les tubes.
7. Ajouter 5 µl de PC EGFR dans les tubes aux positions 1 à 8 et boucher le tube.

Prendre soin d'éviter toute erreur de chargement ou de pipetage pour s'assurer de l'ajout correct de NTC, d'échantillons et de PC EGFR dans les tubes appropriés.

Chaque tube doit contenir un volume réactionnel total de 25 µl (20 µl de master mix de test préparé lors de l'étape 3 (Tableau 6), plus 5 µl de NTC/échantillon/PC). Les chiffres indiquent les positions dans le bloc de chargement et la position finale dans le rotor.

Marquer le couvercle des tubes pour indiquer la direction de chargement des tubes dans l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

8. Une fois tous les tubes de PCR bouchés, vérifier à l'œil nu les niveaux de remplissage des tubes d'échantillon pour garantir que l'échantillon a été ajouté dans chacun d'entre eux.
9. Retourner tous les tubes de PCR quatre fois pour mélanger les échantillons et les mélanges réactionnels.
10. Placer les tubes de PCR sur le rotor de 72 puits dans les positions correspondantes, conformément à la disposition du Tableau 7.

Chaque analyse PCR peut comprendre un maximum de sept échantillons. Si le rotor n'est pas complètement rempli, remplir les positions vides sur le rotor avec des tubes vides bouchés.

11. Placer immédiatement le rotor de 72 puits dans l'instrument Rotor-Gene Q MDx. Vérifier que la bague de fermeture (accessoire de l'instrument Rotor-Gene Q MDx) est placée au-dessus du rotor pour que les tubes ne bougent pas lors de l'analyse.

**Remarque** : en cas d'utilisation de la détection manuelle des mutations EGFR, voir « Annexe A : Protocole manuel du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR », page 75.

12. Lancer le logiciel Rotor-Gene Q series en double-cliquant sur l'icône « *therascreen* EGFR CE Locked Template » située sur le bureau de l'ordinateur portable connecté à l'instrument Rotor-Gene Q MDx (figure 10).



Figure 10. Icône « EGFR CE Locked Template » (détection des mutations EGFR).



13. L'onglet « Setup » (configuration) s'ouvre par défaut (figure 11). S'assurer que la bague de fermeture est correctement fixée, puis cocher la case « Locking Ring Attached » (bague de fermeture fixée). Fermer le couvercle de l'instrument Rotor-Gene Q MDx.

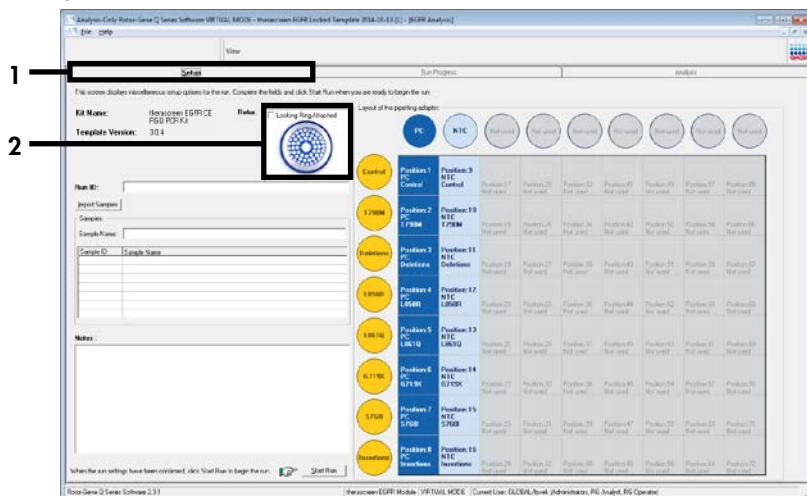


Figure 11. Onglet « Setup » (configuration) (1) et case « Locking Ring Attached » (bague de fermeture fixée) (2).

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

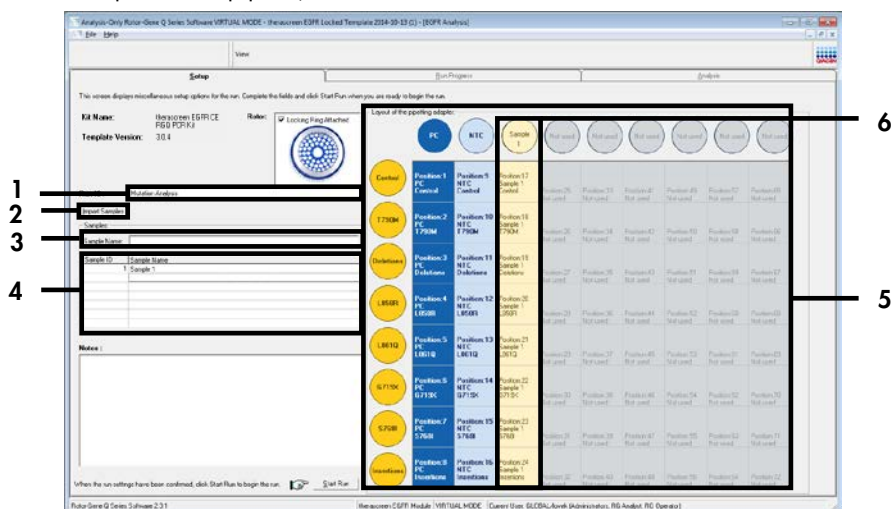
Le nom de l'échantillon est alors ajouté à la liste d'échantillons au-dessous et l'échantillon se voit attribuer un « Sample ID » (ID échantillon) : 1, 2, 3, etc. En outre, le panneau « Layout of the pipetting adapter » (agencement de l'adaptateur de pipette) sur la droite est mis à jour pour afficher le nom de l'échantillon (figure 12).

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

**Remarque** : dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (agencement de l'adaptateur de pipette), vérifier que l'ajout du nom de l'échantillon est mis en évidence par un changement de couleur et que le nom de l'échantillon se trouve à l'emplacement correspondant (figure 12).

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

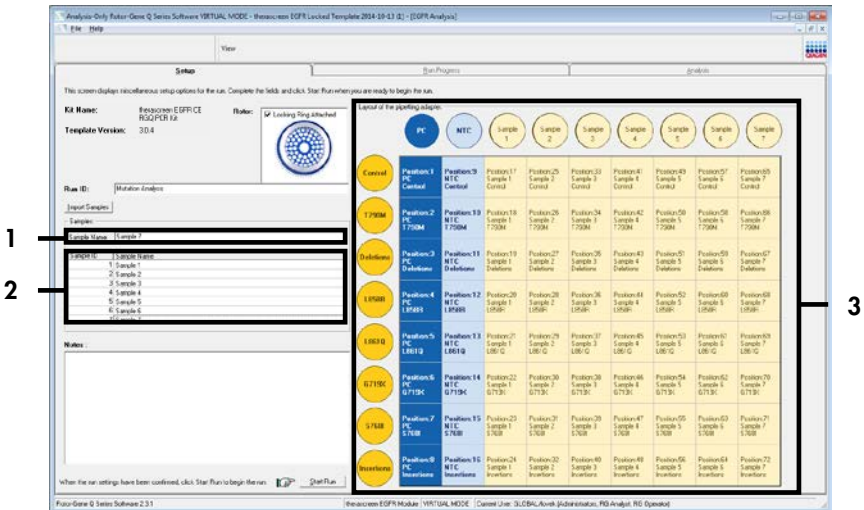
Remarque : les noms d'échantillons comportant plus de huit caractères peuvent ne pas s'afficher entièrement dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (agencement de l'adaptateur de pipette).



**Figure 12. Saisie de l'identifiant d'analyse et du nom d'échantillon.** 1 = champ « Run ID » (identifiant d'analyse), 2 = bouton « Import Samples » (importer des échantillons), 3 = champ « Sample Name » (nom de l'échantillon), 4 = Liste d'échantillons, 5 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (agencement de l'adaptateur de pipette), 6 = cercle de l'échantillon en surbrillance au-dessus d'une colonne de 8 analyses.

15. Répéter l'étape 14 pour saisir les noms de tous les échantillons supplémentaires (figure 13).

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



**Figure 13. Saisie de nouveaux noms d'échantillons dans le champ « Sample Name » (nom d'échantillon).** 1 = champ « Sample Name » (nom de l'échantillon), 2 = liste d'échantillons, 3 = panneau « Layout of the pipetting adaptor » (agencement de l'adaptateur de pipette).

16. Une fois tous les noms d'échantillons saisis, vérifier qu'ils sont corrects. Ajouter toute information complémentaire dans le champ « Notes » si nécessaire et cliquer sur « Start Run » (démarrer l'analyse) (figure 14).

**Remarque :** si une position de rotor est inutilisée, la mention « Warning » (avertissement) s'affiche (figure 14) pour rappeler à l'utilisateur que toutes les positions inutilisées du rotor doivent être occupées par des tubes vides bouchés. Vérifier que toutes les positions inutilisées du rotor sont occupées par des tubes vides bouchés et cliquer sur OK pour continuer.

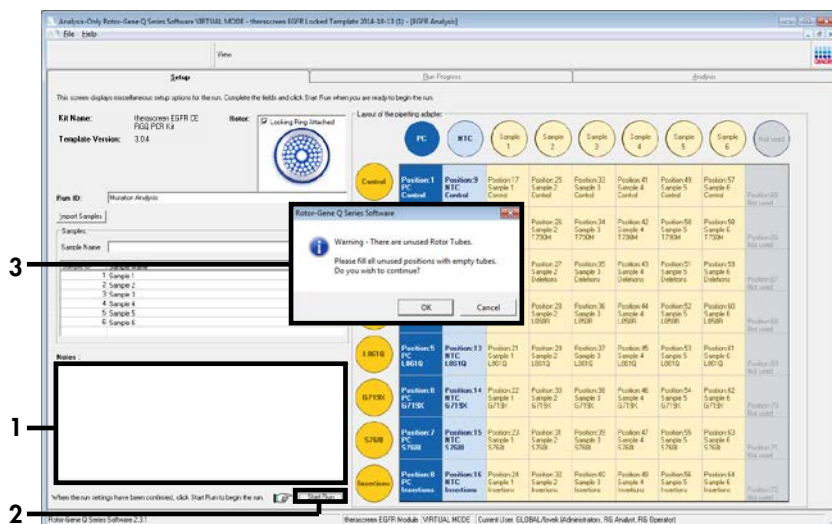
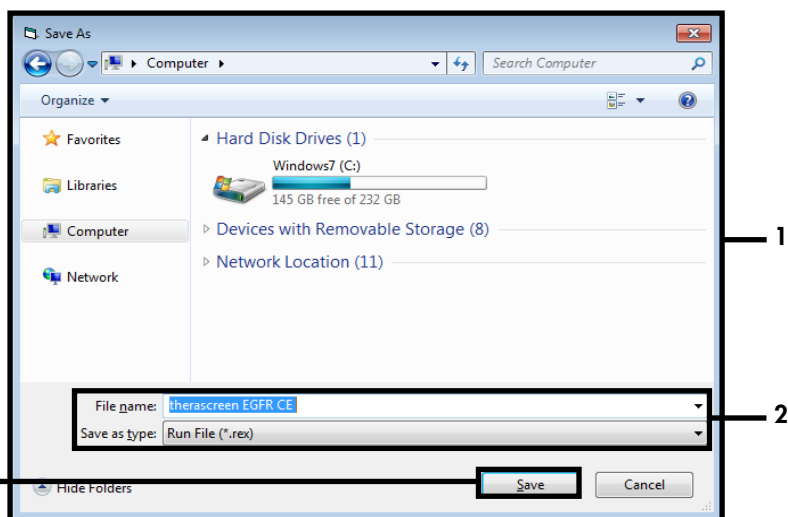


Figure 14. Champ « Notes » (1), bouton « Start Run » (démarrer l'analyse) (2) et avertissement concernant les positions de rotor inutilisées (3).

17. La fenêtre « Save As » (enregistrer sous) s'ouvre. Choisir un nom de fichier approprié et enregistrer l'analyse de PCR dans un fichier d'analyse \*.rex à l'emplacement sélectionné. Cliquer sur « Save » (enregistrer) (figure 15).



**Figure 15. Fenêtre « Save As » (enregistrer sous) (1).** 2 = champs « File name » (nom de fichier) et « Save as type » (type d'enregistrement), 3 = bouton « Save » (enregistrer).

18. L'analyse PCR démarre.

**Remarque :** lorsque l'analyse démarre, l'onglet « Run Progress » (progression de l'analyse) s'ouvre pour indiquer un suivi de la température et le temps restant de l'analyse (figure 16).

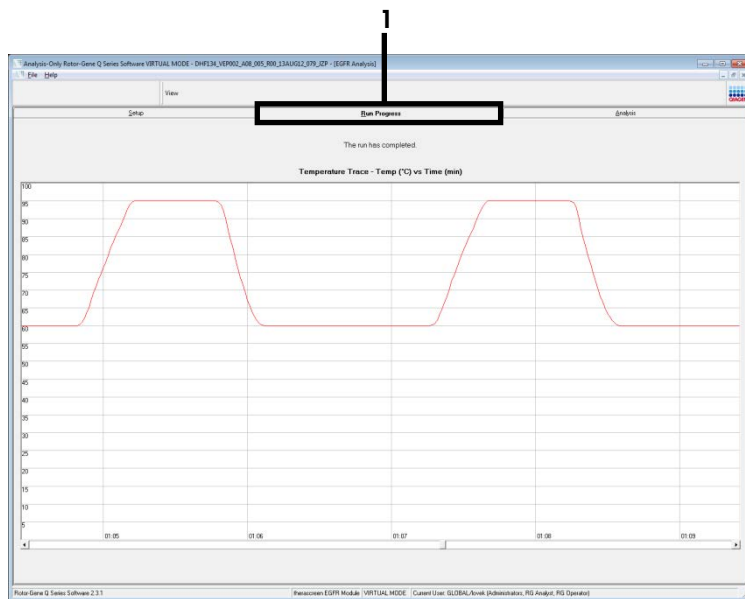


Figure 16. Onglet « Run Progress » (progression de l'analyse).

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

**Remarque** : si l'onglet « Analysis » (analyse) ne s'ouvre pas, cliquer dessus (figure 17).

**Remarque** : la méthode de calcul est expliquée à la section « Interprétation des résultats (automatisée) », page 49.

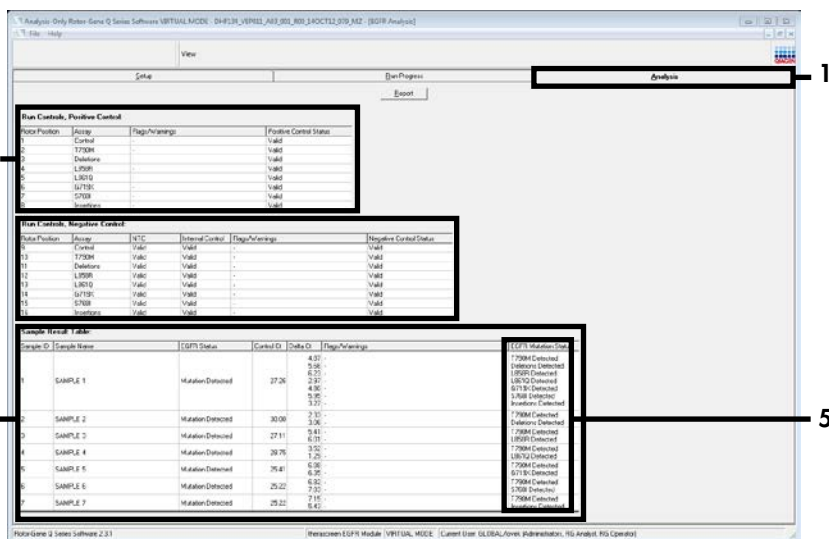


Figure 17. Onglet « Analysis » (1) et rapport de résultats. 2 = panneau « Run Controls, Positive Control » (contrôles d'analyse, contrôle positif), 3 = panneau « Run Controls, Negative Control » (contrôles d'analyse, contrôle négatif), 4 = « Sample Result Table » (tableau de résultats d'échantillons), 5 = panneau « Mutation Status » (état mutationnel).

20. Les résultats de tests sont rapportés comme suit (figure 18).

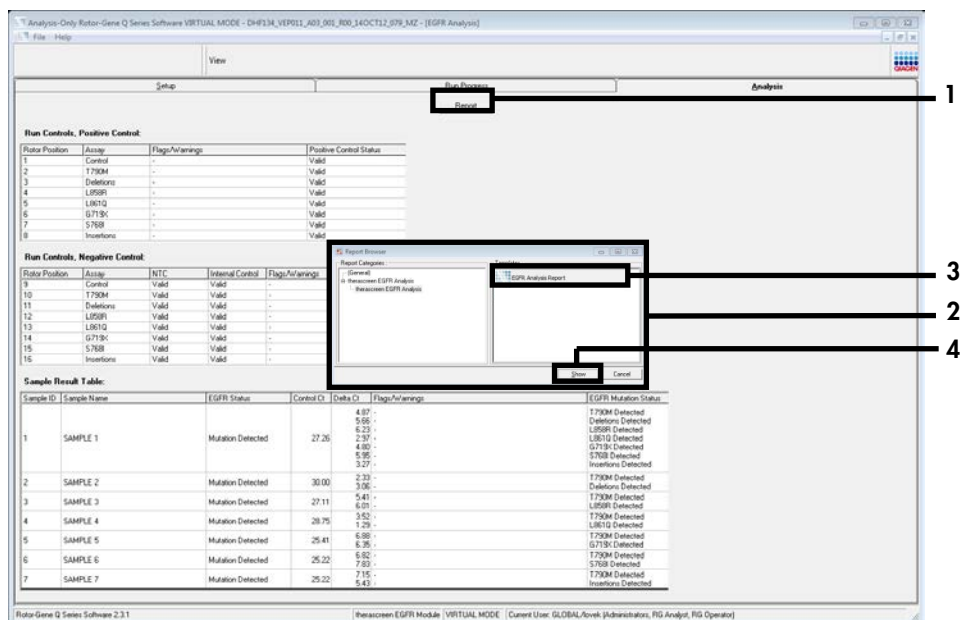
**Run Controls, Positive Control (contrôles d'analyse, contrôle positif) :** Si les résultats se trouvent dans un intervalle acceptable, la colonne « Positive Control Status » (état du contrôle positif) indique « Valid » (valide). Dans le cas contraire, la mention « Invalid » (invalide) s'affiche.

**Run Controls, Negative Control (contrôles d'analyse, contrôle négatif) :** Si les résultats du NTC et du contrôle interne se trouvent dans un intervalle acceptable, la colonne « Negative Control Status » (état du contrôle négatif) indique « Valid ». Dans le cas contraire, la mention « Invalid » s'affiche.

**Tableau de résultats d'échantillons :** Les mutations spécifiques sont rapportées pour les échantillons présentant une mutation positive dans la colonne « EGFR Mutation Status » (état mutationnel du gène EGFR).

21. Cliquer sur « Report » (rapport) pour produire un fichier de rapport. La fenêtre « Report Browser » (navigateur de rapports) s'ouvre alors. Sélectionner « EGFR CE Analysis Report » (rapport d'analyse EGFR CE) sous « Templates » (modèles) et cliquer sur « Show » (afficher) (figure 18).

**Remarque :** pour enregistrer un rapport à un autre emplacement au format archive Web, cliquer sur « Save As » (enregistrer sous) dans le coin supérieur gauche de chaque rapport.



**Figure 18.** Sélection du « EGFR CE Analysis Report » (rapport d'analyse EGFR CE). 1 = « Report » (rapport), 2 = panneau « Report Browser » (navigateur de rapports), 3 = « EGFR CE Analysis Report » (rapport d'analyse EGFR CE), 4 = « Show » (afficher).



# Interprétation des résultats (automatisée)

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

**Remarque :** pour l'analyse manuelle des résultats, voir « Interprétation des résultats (manuelle) », page 91.

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

Le logiciel Rotor-Gene Q interpole les signaux de fluorescence entre deux valeurs enregistrées. Les valeurs  $C_T$  peuvent alors être tout nombre réel (entier ou non) compris dans un intervalle de 0 à 40. Pour le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, la valeur seuil est définie à 0,075 unité de fluorescence relative pour le canal vert (FAM) et 0,02 pour le canal jaune (HEX). Ces valeurs sont configurées automatiquement dans le logiciel *therascreen* EGFR CE Assay Package. Les contrôles d'analyse (PC, NTC et IC) sont évalués pour assurer que les valeurs  $C_T$  sont acceptables et que les réactions sont correctes.

Les valeurs  $\Delta C_T$  des échantillons sont calculées pour chaque test de mutation au moyen de l'équation suivante :

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

On estime que les échantillons présentent une mutation positive si leur  $\Delta C_T$  est inférieur ou égal à la valeur  $\Delta C_T$  seuil de ce test. Au-dessus de cette valeur, l'échantillon peut soit contenir moins que le pourcentage de mutation détectable par le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (au-delà de la limite des tests), soit présenter une mutation négative et être rapporté comme « No Mutation Detected » (aucune mutation détectée).

L'absence d'amplification dans les réactions de mutation est rapportée en tant que « No Mutation Detected ». Les valeurs  $\Delta C_T$  calculées à partir de l'amplification du bruit de fond sont censées être supérieures aux valeurs  $\Delta C_T$  seuil et l'échantillon est classé comme « No Mutation Detected ».

Les résultats de tests s'affichent comme suit : « Mutation Detected » (mutation détectée), « No Mutation Detected », « Invalid » (invalide) ou, en cas d'échec d'un contrôle d'analyse, « Run Control Failed ». Pour les échantillons présentant une mutation positive, les mutations spécifiques sont rapportées. Une tumeur peut contenir plusieurs mutations. Dans un tel cas, plusieurs mutations sont rapportées.

## Messages du logiciel Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package

Tableau 8 (page suivante) répertorie les avertissements pouvant être générés par le logiciel Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package, leur signification et les actions à entreprendre.

Les noms de messages sont formés de façon à fournir des informations sur le composant attribué du kit, l'échantillon ou le contrôle attribué et le mode d'échec.

Par exemple :

- PC\_CTRL\_ASSAY\_FAIL = le test de contrôle (CTRL\_ASSAY) du contrôle positif (PC) a échoué (FAIL)

- NTC\_INT\_CTRL\_FAIL = le contrôle interne (INT\_CTRL) du contrôle négatif (NTC) a échoué (FAIL)  
SAMPLE\_CTRL\_HIGH\_CONC = le test de contrôle (CTRL) de l'échantillon (SAMPLE) présente une concentration élevée (HIGH\_CONC)

Tableau 8. Messages, significations et actions à entreprendre

Message	Signification	Action
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Analyse PCR invalide, C <sub>T</sub> FAM hors intervalle pour le contrôle positif lors de la réaction de contrôle.	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Analyse PCR invalide, C <sub>T</sub> FAM hors intervalle pour au moins une réaction du contrôle de mutation.	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Analyse PCR invalide, impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle positif (mélange réactionnel de contrôle).	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Analyse PCR invalide, impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle positif (mélange réactionnel de mutation).	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Analyse PCR invalide, contrôle interne au-dessus de l'intervalle pour le contrôle négatif.	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Analyse PCR invalide, contrôle interne au-dessous de l'intervalle pour le contrôle négatif.	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
NTC_INVALID_CT	Analyse PCR invalide, FAM invalide (inférieur à la limite) pour le contrôle négatif.	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.

Message	Signification	Action
NTC_INVALID_DATA	Analyse PCR invalide, impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle négatif.	Répéter l'analyse PCR dans son intégralité.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Échantillon invalide, impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle d'échantillon.	Configurer une nouvelle analyse PCR pour répéter le ou les échantillons concernés.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Échantillon invalide, CT FAM trop faible dans le contrôle d'échantillon.	Diluer l'échantillon pour augmenter la valeur $C_T$ du contrôle. Cette dilution doit être calculée d'après l'hypothèse selon laquelle une dilution de 1:1 dans l'eau fournie avec le kit augmente le $C_T$ de 1,0. Une fois l'échantillon dilué, configurer une nouvelle analyse d'évaluation de la mutation pour répéter l'échantillon. Ou si l'échantillon a été dilué suite à l'analyse d'évaluation de l'échantillon d'ADN, procéder directement à la détection de la mutation EGFR avec un échantillon dilué.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Échantillon invalide, $C_T$ FAM trop élevé dans la réaction du contrôle d'échantillon.	Configurer une nouvelle analyse PCR pour répéter l'échantillon. Si l'échantillon demeure invalide lors de la nouvelle analyse PCR et que la quantité d'ADN est toujours insuffisante, extraire deux coupes de tissu FFPE supplémentaires si possible. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester cette extraction. Si l'échantillon est invalide, répéter l'analyse PCR lors de la deuxième extraction. Si le résultat n'est toujours pas valide après cette analyse, l'état mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué.

Message	Signification	Action
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	CT trop élevé (ou aucun C <sub>T</sub> ) pour le contrôle interne (HEX), canal FAM présentant une mutation négative.	<p>Pour les échantillons qui génèrent un avertissement SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (échantillon positif et invalide) avec une mutation détectée (ou non détectée) dans un mélange réactionnel de mutation cliniquement pertinente, rapporter les résultats. Aucun test supplémentaire n'est requis.</p> <p>Diluer l'échantillon dans l'eau fournie avec le kit selon l'hypothèse qu'une dilution 1:1 augmentera le C<sub>T</sub> de la réaction de contrôle d'1,0 afin de garantir que le volume final sera &gt; 40 µl (par ex. 40 µl d'ADN et 40 µl d'eau du tube marqué DIL).</p> <p>Configurer une nouvelle analyse PCR pour répéter l'échantillon. S'il demeure invalide lors de la nouvelle analyse PCR, extraire l'échantillon à partir de deux coupes FFPE supplémentaires. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester cette extraction.</p> <p>Si la deuxième extraction est invalide, diluer comme décrit ci-dessus.</p> <p>Si le résultat n'est toujours pas valide après cette analyse, l'état mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué.</p>
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Tube de mutation invalide, C <sub>T</sub> HEX trop faible pour l'échantillon (contrôle interne).	<p>Pour les échantillons qui génèrent un avertissement SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (échantillon positif et invalide) avec une mutation détectée (ou non détectée) dans un mélange réactionnel de mutation cliniquement pertinente, rapporter les résultats. Aucun test supplémentaire n'est requis.</p> <p>Configurer une nouvelle analyse PCR pour répéter l'échantillon. Si celui-ci demeure invalide lors de la nouvelle analyse PCR, extraire deux coupes de tissu FFPE supplémentaires si possible. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester cette extraction. Si le résultat est invalide, répéter l'analyse PCR lors de la deuxième extraction. Si le résultat n'est toujours pas valide après cette analyse, l'état mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué.</p>

Message	Signification	Action
SAMPLE_INVALID_DATA	Tube de mutation invalide, impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle interne.	<p>Pour les échantillons qui génèrent un avertissement SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (échantillon positif et invalide) avec une mutation détectée (ou non détectée) dans un mélange réactionnel de mutation cliniquement pertinente, rapporter les résultats. Aucun test supplémentaire n'est requis.</p> <p>Configurer une nouvelle analyse PCR pour répéter l'échantillon. Si celui-ci demeure invalide lors de la nouvelle analyse PCR, extraire deux coupes de tissu FFPE supplémentaires si possible. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester cette extraction. Si le résultat est invalide, répéter l'analyse PCR lors de la deuxième extraction. Si le résultat n'est toujours pas valide après cette analyse, l'état mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué.</p>

Message	Signification	Action
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Au moins une mutation d'un échantillon est positive, et au moins une mutation du même échantillon est invalide.	<p>Pour les échantillons qui génèrent un avertissement SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (échantillon positif et invalide) avec une mutation détectée (ou non détectée) dans un mélange réactionnel de mutation cliniquement pertinente, rapporter les résultats. Aucun test supplémentaire n'est requis.</p> <p>Pour les échantillons qui génèrent un avertissement SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (échantillon positif et invalide) avec un résultat INVALID (invalide) obtenu dans un mélange réactionnel de mutation cliniquement pertinente, retester l'échantillon avec tous les mélanges réactionnels en effectuant l'action de l'avertissement invalide spécifique.</p> <p>Si un avertissement SAMPLE_INT_CTRL_FAIL est généré en association avec un autre avertissement pour l'échantillon affecté, l'action de dilution de l'échantillon de l'avertissement SAMPLE_INT_CTRL_FAIL doit être effectuée. Configurer une nouvelle analyse PCR et retester l'échantillon.</p> <p>Pour les échantillons qui génèrent un avertissement SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (échantillon positif et invalide) avec un résultat INVALID (invalide) obtenu dans un mélange réactionnel de mutation cliniquement pertinente lors de la nouvelle analyse PCR, extraire l'échantillon de deux coupes FFPE supplémentaires. Configurer une nouvelle analyse PCR avec tous les mélanges réactionnels pour tester cette extraction.</p> <p>Si cet échantillon entraîne à nouveau un résultat invalide pour un mélange réactionnel de mutation cliniquement pertinente, répéter l'échantillon avec tous les mélanges réactionnels en effectuant l'action de l'avertissement invalide spécifique. Si l'avertissement SAMPLE_INT_CTRL_FAIL est généré en association avec un autre avertissement pour l'échantillon affecté, l'action de dilution de l'échantillon de l'avertissement SAMPLE_INT_CTRL_FAIL doit être effectuée. Configurer une nouvelle analyse PCR et retester cet échantillon.</p> <p>Si l'avertissement SAMPLE_POS_AND_INVALID apparaît suite à la répétition du test, l'état mutationnel de l'échantillon est indéterminé.</p>

# Guide de dépannage

Ce guide 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](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Les scientifiques des Services techniques de 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 d'analyses (pour les coordonnées, voir la quatrième de couverture ou le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Commentaires et suggestions

---

### Les échantillons NTC indiquent des résultats positifs dans le canal FAM vert

La contamination s'est produite lors de la préparation de la PCR

Répéter la PCR en double avec des réactifs encore non utilisés.  
Si possible, fermer les tubes de PCR juste après l'addition de l'échantillon à tester.  
S'assurer que les surfaces de travail et les appareils sont décontaminés régulièrement.

### Aucun signal avec le contrôle positif EGFR

- |   |   |
|---|---|
| a) Le canal de fluorescence sélectionné pour l'analyse des données de PCR n'est pas conforme au protocole   | Pour l'analyse des données, sélectionner le canal de fluorescence Cycling Green pour la PCR analytique d'EGFR et le canal de fluorescence Cycling Yellow pour la PCR du contrôle interne. |
| b) Programmation incorrecte du profil de température sur l'instrument RotorGene Q MDx   | Comparer le profil de température avec le protocole. S'il est incorrect, répéter l'analyse.   |
| c) Configuration incorrecte de la PCR   | Vérifier les étapes de travail à l'aide du schéma de pipettage et répéter la PCR si nécessaire.   |
| d) Les conditions de stockage d'un ou plusieurs composants du kit ne respectaient pas les instructions fournies dans la section « Stockage et manipulation des réactifs » (page 19) | Vérifier les conditions de conservation et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit si nécessaire.   |
| e) Le kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR a expiré  | Vérifier les conditions de conservation et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit si nécessaire.   |



# Contrôle qualité

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

## Limitations

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

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

Le produit est destiné à être utilisé uniquement sur l'instrument de PCR en temps réel Rotor-Gene Q MDx.

Il est nécessaire de se conformer strictement au *manuel du kit theascreen EGFR RGQ PCR* pour obtenir des résultats optimaux. Il n'est pas recommandé de diluer les réactifs d'une autre manière que celle décrite dans ce manuel dans la mesure où les performances en seraient affectées.

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

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

## Caractéristiques de performances

### Performances analytiques

Les caractéristiques de performances spécifiques du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR ont été déterminées au moyen d'études utilisant des échantillons de tissu FFPE prélevés sur des patients atteints de CPNPC et des lignées cellulaires humaines de FFPE (lignées cellulaires FFPE). Les lignées cellulaires FFPE ont été générées à l'aide d'une lignée cellulaire de carcinome pulmonaire (A549) pour produire des lignées cellulaires portant les mutations EGFR spécifiques souhaitées. Lorsque des échantillons de tissu ou des lignées cellulaires n'étaient pas disponibles, de l'ADN plasmidique a été utilisé.

### Limite du blanc (LOB), intervalle de fonctionnement et valeurs seuil

Au total, 417 échantillons FFPE ont été testés dans une étude conforme aux directives du NCCLS EP17-AA (2004) (12) afin de déterminer la limite du blanc (LOB) et les valeurs seuil pour chaque test de mutation. En outre, l'intervalle de fonctionnement a été déterminé. Les valeurs seuil ont été établies et sont présentées dans le Tableau 9.

**Tableau 9. Valeurs seuil établies pour chaque test de mutation**

Test	Seuil ( $\Delta$ CT)
T790M	$\leq 7,40$
Délétions	$\leq 8,00$
L858R	$\leq 8,90$
L861Q	$\leq 8,90$
G719X	$\leq 8,90$
S768I	$\leq 8,90$
Insertions	$\leq 8,00$

L'intervalle  $C_T$  de la réaction du contrôle a été établi entre 23,70 et 31,10  $C_T$ .

Les valeurs seuil et les intervalles de fonctionnement du test ont été vérifiés à l'aide des standards et de d'autres échantillons FFPE. Lors de la vérification, la capacité des valeurs seuil à distinguer la bonne mutation dans le bruit de fond d'un ADN de type sauvage a été évaluée en examinant chaque test avec une concentration élevée d'ADN génomique d'entrée et une concentration élevée d'ADN de mutation d'entrée (voir « Réactivité croisée », page 60). L'effet du niveau d'ADN d'entrée sur la détection des mutations a aussi été évalué (voir « Effet du niveau d'entrée d'ADN sur les valeurs  $\Delta C_T$  », page 59).

Afin d'évaluer les performances du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR en l'absence de matrice et d'assurer qu'un blanc d'échantillon ou un échantillon contenant de l'ADN de type sauvage ne génèrent pas de signal analytique pouvant indiquer une faible concentration de mutation, des échantillons sans matrice et de l'ADN de type sauvage d'EGFR de CPNPC ont été évalués. Les résultats n'ont révélé aucune détection de mutation positive pour les échantillons NTC et pour les échantillons FFPE de type sauvage.

## Effet du niveau d'entrée d'ADN sur les valeurs $\Delta C_T$

Le niveau d'entrée d'ADN est défini comme la quantité totale d'ADN amplifiable d'EGFR dans un échantillon, tel que déterminé par les valeurs  $C_T$  de la réaction de contrôle. Pour démontrer que les performances du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR sont cohérentes sur tout l'intervalle de valeurs  $C_T$  de réaction de contrôle (23,70 à 31,10), les sept tests de mutations EGFR ont été évalués par rapport à une série de dilution 1 pour 3 à 6 points (ADN extrait de lignées cellulaires FFPE). La valeur  $C_T$  cible pour la dilution 1 était d'environ 24,70 pour chaque mutation. La dilution finale, qui a produit un  $C_T$  d'environ 32 à 33, était en dehors de l'intervalle de valeurs  $C_T$  de réaction de contrôle. Les valeurs  $\Delta C_T$  mesurées à différents niveaux d'entrée d'ADN total étaient généralement cohérentes sur l'intervalle de fonctionnement du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

## Réactivité croisée

L'ADN d'EGFR de type sauvage à des niveaux élevés d'entrée d'ADN a été testé pour évaluer l'amplification non spécifique. Les résultats ont prouvé que les valeurs  $\Delta C_T$  les plus faibles dépassaient les seuils établis, ce qui indique qu'aucune amplification non spécifique n'a eu lieu.

Les lignées cellulaires FFPE présentant un niveau élevé d'entrée d'ADN ont été testées par rapport à tous les mélanges réactionnels pour évaluer la réactivité croisée potentielle. Les résultats ont démontré qu'il n'y avait aucun impact du à la réactivité croisée entre les réactions mutantes. Les valeurs  $\Delta C_T$  minimales étaient toutes supérieures aux valeurs seuil des tests respectifs pour tous les échantillons d'ADN et mélanges réactionnels non correspondants.

## Exactitude : comparaison avec la méthode de référence analytique

Une étude a démontré la concordance de la détection des mutations par le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR par rapport au séquençage bidirectionnel Sanger. Dans cette étude, 360 échantillons FFPE ont été testés.

Les échantillons présentant des résultats valides à la fois avec le kit Sanger et le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR ont été analysés pour évaluer la concordance positive en pourcentage (Positive Percent Agreement, PPA), la concordance négative en pourcentage (Negative Percent Agreement, NPA) et la concordance globale en pourcentage (Overall Percent Agreement, OPA). Ces pourcentages, ainsi que les intervalles de confiance (confidence intervals, CI) bilatéraux à 95 % correspondants, sont résumés dans le Tableau 10.

**Tableau 10. Analyse de la concordance**

Mesure	Concordance en pourcentage (N)	CI à 95 %
Concordance positive en pourcentage	99,4 % (157/158)	96,5-100,0 %
Concordance négative en pourcentage	86,6% (175/202)	81,2-91,0 %
Concordance globale en pourcentage	92,2% (332/360)	89,0-94,8 %

Pour les 28 résultats ne présentant pas de concordance globale en pourcentage :

- 1 (3,6 %) échantillon était de type sauvage (aucune mutation détectée) avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, mais a présenté un résultat « mutation détectée » avec le séquençage Sanger.
- 27 (96,4 %) échantillons ont présenté un résultat « mutation détectée » avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, mais ont présenté un résultat « type sauvage » avec le séquençage Sanger.

## Valeurs de limite de détection (LOD)

Une étude a été réalisée pour déterminer la LOD de chacune des 29 mutations EGFR. La LOD a été déterminée comme étant la quantité la plus basse d'ADN mutant dans un bruit de fond d'ADN de type sauvage avec laquelle un échantillon mutant donne des résultats de mutation positifs dans 95 % des résultats de test ( $C_{95}$ ).

Pour déterminer la LOD de chaque mutation, des échantillons présentant différents pourcentages de mutation ont été préparés à des concentrations d'ADN d'entrée faibles et élevées puis analysés avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (Tableau 11). La LOD pour chaque test a été calculée par régression logistique. Pour vérifier la LOD, les échantillons de mutation à la LOD déterminée ont été testés et le taux de tests positifs a été vérifié.

**Tableau 11. LOD établie à l'aide d'échantillons cliniques FFPE d'entrée d'ADN faibles et élevés, de lignées cellulaires FFPE ou de plasmides**

Exon	Mutation	ID COSMIC*	Changement de base	LOD (% mutant)	
				Faible	Élevé
18	G719A	6239	2156G>C	7,41 <sup>†</sup>	1,57 <sup>†</sup>
	G719S	6252	2155G>A	5,08 <sup>‡</sup>	7,75 <sup>§</sup>
	G719C	6253	2155G>T	10,30 <sup>‡</sup>	— <sup>¶</sup>
19	Délétions	12384	2237_2255>T	1,58 <sup>§</sup>	0,49 <sup>§</sup>
		12387	2239_2258>CA	4,91 <sup>†</sup>	1,48 <sup>†</sup>
		12419	2238_2252>GCA	16,87 <sup>†</sup>	12,47 <sup>†</sup>
		12422	2238_2248>GC	3,24 <sup>†</sup>	1,65 <sup>†</sup>
		13551	2235_2252>AAT	4,24 <sup>†</sup>	1,41 <sup>†</sup>
		12678	2237_2251del15	0,55 <sup>§</sup>	0,24 <sup>§</sup>
		6218	2239_2247del9	8,47 <sup>†</sup>	— <sup>¶</sup>
		12728	2236_2253del18	2,43 <sup>†</sup>	— <sup>¶</sup>
		12367	2237_2254del18	2,72 <sup>†</sup>	— <sup>¶</sup>
		6210	2240_2251del12	4,09 <sup>†</sup>	— <sup>¶</sup>
		6220	2238_2255del18	2,70 <sup>†</sup>	0,82 <sup>†</sup>
		6223	2235_2249del15	6,40 <sup>†</sup>	1,63 <sup>†</sup>
		6225	2236_2250del15	2,80 <sup>†</sup>	1,42 <sup>†</sup>
		6254	2239_2253del15	0,86 <sup>§</sup>	0,47 <sup>§</sup>
		6255	2239_2256del18	0,14 <sup>§</sup>	0,05 <sup>§</sup>
		12369	2240_2254del15	4,94 <sup>§</sup>	1,56 <sup>§</sup>
		12370	2240_2257del18	8,10 <sup>§</sup>	2,08 <sup>§</sup>
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C	0,25 <sup>§</sup>	0,10 <sup>§</sup>
		12383	2239_2251>C	4,58 <sup>§</sup>	1,74 <sup>§</sup>
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 <sup>†</sup>	2,18 <sup>†</sup>
	Insertions	12376	2307_2308insGCCAGCGTG	11,61 <sup>†</sup>	— <sup>¶</sup>
		12378	2310_2311insGGT	4,91 <sup>†</sup>	1,31 <sup>†</sup>
		12377	2319_2320insCAC	2,40 <sup>†</sup>	0,65 <sup>†</sup>
	T790M	6240	2369C>T	9,72 <sup>†</sup>	5,09 <sup>†</sup>
21	L858R	6224	2573T>G	5,94 <sup>†</sup>	1,13 <sup>†</sup>

Exon	Mutation	ID COSMIC*	Changement de base	LOD (% mutant)	
				Faible	Élevé
	L861Q	6213	2582T>A	2,22 <sup>†</sup>	0,66 <sup>‡</sup>

\* COSMIC : Catalogue of somatic mutations in cancer (catalogue des mutations somatiques associées au cancer) : <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

<sup>†</sup> Les valeurs de la LOD ont été établies à l'aide de lignées cellulaires.

<sup>‡</sup> Les valeurs de la LOD ont été établies à l'aide de plasmides.

<sup>§</sup> Les valeurs de la LOD ont été établies à l'aide d'échantillons cliniques.

<sup>¶</sup> Non évalué

## Interférence

### Effets des tissus nécrotiques

Les échantillons cliniques FFPE de CPNPC avec une teneur en tissu nécrotique de 50 % maximum pour les échantillons mutants EGFR et de type sauvage n'ont pas interféré avec les résultats de détection du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

### Substances exogènes

Les substances potentiellement interférentes présentes lors du processus d'extraction de l'ADN ont été testées dans des échantillons mutants et de type sauvage à la concentration 10x : cire de paraffine, xylène, éthanol et protéinase K. Les résultats ont démontré que ces substances n'interféraient pas avec les résultats de détection du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

## Reproductibilité

### Reproductibilité d'un lot à l'autre

Le système de test du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR utilise deux kits distincts : le kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue ou le kit QIAamp DNA FFPE Tissue pour l'isolement de l'ADN, et le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR pour l'amplification de l'ADN et la détection de l'état mutationnel du gène EGFR. La reproductibilité d'un lot à l'autre et l'interchangeabilité ont été démontrées à l'aide de trois lots du kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue et de trois lots

du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Le pourcentage moyen de détections correctes avec les lots du test de mutations EGFR était de 97,8 % (317/324) et celui des échantillons de type sauvage était de 100 % (379/379).

## Manipulation des échantillons

La reproductibilité du kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue a été évaluée à l'aide de sections prélevées sur trois blocs d'échantillons FFPE, à savoir un échantillon avec délétion dans l'exon 19 (2235-2249 del15), un échantillon avec mutation L858R dans l'exon 21 et un échantillon de type sauvage. Pour chaque échantillon, des extractions ont été effectuées en double sur trois sites et testées lors de trois jours non consécutifs sur une période de six jours, produisant un total de 18 points de données par échantillon. Sur chaque site, deux opérateurs ont effectué les tests en utilisant un lot du kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (un lot par site, trois lots au total) conjointement au même lot de réactifs du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR sur les sites. Tous les résultats d'échantillons mutants et de type sauvage étaient valides et ont produit le résultat de détection attendu (détection correcte = 100 %, 18/18 pour chaque échantillon), ce qui vient appuyer la reproductibilité et la répétabilité du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR lors de l'étape pré-analytique d'isolement de l'ADN.

## Précision et reproductibilité

La précision et la reproductibilité du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR ont été étudiées en testant de l'ADN extrait d'échantillons cliniques FFPE de CPNPC ou de lignées cellulaires FFPE représentant les sept tests de mutation du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Les échantillons cliniques FFPE de type sauvage de CPNPC ont aussi été inclus dans l'étude (tableau 12).

L'étude a été conçue en suivant une matrice pour évaluer la reproductibilité des tests en analysant les échantillons dans trois laboratoires (sites), avec trois lots de kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (trois lots sur trois sites), deux opérateurs par site, deux instruments par site, chaque échantillon (préparé à un niveau proche de la LOD) étant testé en double, sur une période totale de 16 jours. La reproductibilité de chaque mutation individuelle a été testée



lors de jours non consécutifs sur chaque site. Le taux de détections correctes est indiqué dans le Tableau 12, page suivante.

**Tableau 12. Reproductibilité des tests : taux de détections correctes pour les mutations EGFR testées**

Exon	Mutation	ID COSMIC*	Détections		% correctes CI à 95 % unilatéral minimal
			Correctes/total	% correctes	
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06
19	Délétions	12384	92/92	100	96,80
		12387	95/95	100	96,90
		12419	83/83	100	96,46
		12422	94/94	100	96,86
		13551	95/95	100	96,90
		6220	96/96	100	96,93
		6223	95/95	100	96,90
		6225	91/95	95,79	90,62
		6254	92/92	100	96,80
		6255	94/96	97,92	93,59
		12369	95/95	100	96,90
		12370	62/63	98,41	92,69
		12382	92/95	96,84	92,04
		12383	93/93	100	96,83
20	S768I	6241	82/82	100	96,41
	Insertions	12376	92/92	100	96,80
		12378	93/93	100	96,83
		12377	94/94	100	96,86
	T790M	6240	92/92	100	96,80
21	L858R	6224	83/84	98,81	94,48
	L861Q	6213	84/84	100	96,50
Type sauvage	—	—	77/78	98,72	94,06

\* COSMIC : Catalogue of somatic mutations in cancer (catalogue des mutations somatiques associées au cancer) : <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Une analyse de composante de variance a été effectuée pour estimer l'écart-type et les intervalles de confiance à 95 % pour la variabilité intra-analyse, inter-analyse, inter-jour, interlot et intersite. Parmi les composantes de variance, le coefficient de variation total (CV) était  $\leq 14,11$  % pour toutes les mutations EGFR testées. Parmi tous les membres du panel mutant, le CV en pourcentage était  $\leq 8,33$  % pour la variabilité interlot, inter-jour et inter-analyse. Le CV en pourcentage pour la variabilité intra-analyse (répétabilité/précision) était compris entre 5,99 % et 13,49 %.

## Performances cliniques

### Résultats cliniques : GIOTRIF®

L'essai clinique LUX-Lung 3 était un essai clinique ouvert international multicentrique de phase 3 randomisé comparant l'efficacité de l'afatinib à une chimiothérapie en traitement de première ligne, chez des patients présentant un adénocarcinome du poumon de stade IIIB ou IV muté pour EGFR (ClinicalTrials.gov, numéro NCT00949650). L'admissibilité des patients à l'essai clinique a été déterminée par le test de l'état mutationnel d'EGFR chez le patient au moyen du test clinique (CTA pour Clinical Trial Assay). Des tests rétrospectifs d'échantillons de tissus ont été effectués avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Une étude de transition a été réalisée afin d'évaluer la concordance entre le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR et le CTA.

À partir des résultats du CTA, 345 patients étaient dans l'ensemble randomisé (afatinib : 230 patients ; chimiothérapie : 115 patients). Le critère principal d'efficacité était la survie sans progression (SSP) telle qu'évaluée par un comité d'examen indépendant (CEI). Parmi les 345 patients randomisés, les échantillons tumoraux de 264 patients (afatinib : 178 patients ; chimiothérapie : 86 patients) ont été testés rétrospectivement avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Une amélioration significative de la SSP telle que déterminée par le CEI a été démontrée chez les patients randomisés à l'afatinib par rapport à ceux randomisés à la chimiothérapie, chez la population générale positive au CTA et la population positive au kit *therascreen* EGFR RGQ PCR/au CTA. Les résultats d'efficacité générale sont résumés dans le Tableau 13 et la figure 19.

Tableau 13. Bénéfices cliniques des patients testés avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR au sein de la population de l'essai clinique LUX-Lung 3

Paramètre	Population positive au kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR/au CTA n = 264		Population CTA+, n = 345	
	Chimiothérapi n = 86	Afatinib n = 178	Chimiothérapie n = 115	Afatinib n = 230
<b>Survie sans progression, SSP</b>				
Nombre de morts ou de progressions, N (%)	53 (61,6 %)	120 (67,4%)	69 (60,0%)	152 (66,1%)
SSP médiane (mois)	6,9	11,2	6,9	11,1
SSP médiane, IC à 95 %	5,3 ; 8,2	9,7 ; 13,7	5,4 ; 8,2	9,6 ; 13,6
Rapport de risque	0,49		0,58	
Rapport de risque, IC à 95 %	0,35 ; 0,69		0,43 ; 0,78	
Valeur P (test logarithmique par rangs stratifié)*	<0,0001		<0,001	

\* Stratifié par état mutationnel d'EGFR et race.

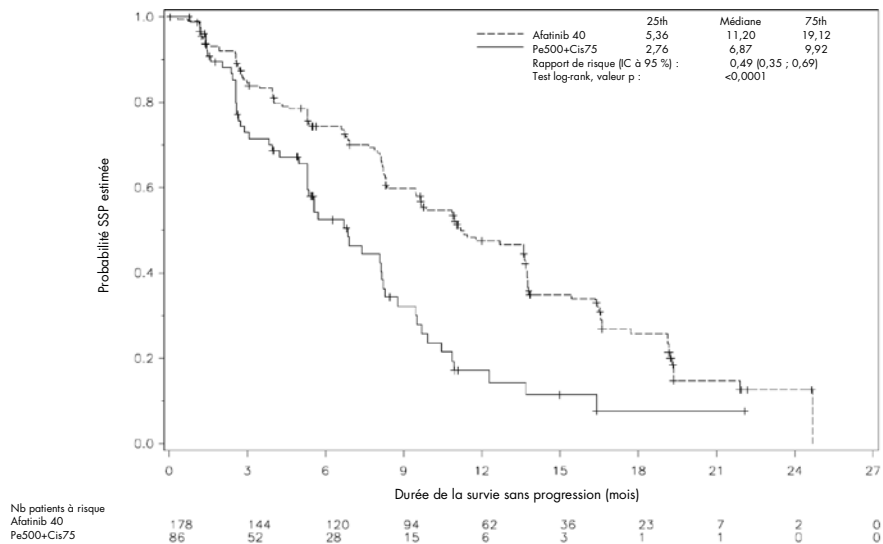


Figure 19. Courbe Kaplan-Meier de la survie sans progression (SSP) d'après un examen indépendant par un groupe de traitement (population positive au kit *therascreen* EGFR RGQ PCR/au CTA).

L'analyse du sous-ensemble positif au kit *therascreen* EGFR RGQ PCR et au CTA (n = 264) a révélé que les patients traités à l'afatinib présentaient une augmentation significative du temps de SSP (SSP médiane 11,2 mois contre 6,9) et étaient moins susceptibles de présenter une maladie progressive ou de mourir (RR = 0,49, IC à 95 % [0,35 ; 0,69], p < 0,0001) que les patients sous chimiothérapie. Les bénéfices cliniques observés dans le sous-ensemble de patients testés avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR étaient comparables à ceux observés chez l'ensemble de la population de l'étude (n = 345).

## Résultats cliniques : IRESSA®

L'essai IFUM (mesure de suivi IRESSA) était une étude ouverte à un seul bras de phase 4 (NCT01203917) destinée à définir l'efficacité et l'innocuité/la tolérabilité du géfitinib de première intention chez les patients caucasiens atteints de CPNPC localement avancé ou métastasé de phase IIIA/B/IV, positif à la mutation EGFR. L'étude IFUM a été conçue pour évaluer le taux de réponse objective selon les critères RECIST chez les patients caucasiens atteints de CPNPC et présentant la mutation EGFR, sélectionnés de manière prospective.

Les patients admissibles devaient présenter une délétion au niveau de l'exon 19 de l'EGFR, une mutation de substitution, L858R, L861Q ou G719X, et aucune mutation T790M ou S768I, ni insertion dans l'exon 20 dans les prélèvements tumoraux comme déterminé de manière prospective au moyen du test clinique (CTA pour Clinical Trial Assay). Des tests rétrospectifs d'échantillons issus de patients dépistés avec l'essai clinique IFUM ont été effectués à l'aide du kit de diagnostic compagnon *therascreen* EGFR RGQ PCR. Une étude de transition a été réalisée afin d'évaluer la concordance du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR avec le CTA utilisé pour sélectionner les patients admis à l'essai clinique IFUM. La concordance générale entre les deux tests pour la détection de délétions dans l'exon 19 de l'EGFR et de la mutation L858R était de 98,2 % (n = 700/713 ; IC 95 % : 96,9 %, 99,0 %) avec une concordance positive en pourcentage de 88,2 % (n = 90/102 ; IC 95 % : 80,4 %, 93,8 %) et une concordance négative en pourcentage de 99,8 % (n = 610/611 ; IC 95 % : 99,1 %, 100,0 %).

Les résultats du CTA ont été obtenus pour 859 patients dépistés. Parmi eux, 106 patients étaient admissibles au traitement au géfitinib. Sur 859 échantillons ayant obtenu un résultat au CTA, 765 échantillons étaient disponibles pour des tests rétrospectifs à l'aide du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, dont 87 échantillons se sont révélés positifs à la mutation EGFR à l'issue de tests réalisés avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR et du CTA.

Le critère principal d'efficacité était le taux de réponse objective (TRO) tel qu'évalué par un comité d'examen central indépendant en aveugle (Blinded Independent Central Review, BICR) et des enquêteurs. Les bénéfices cliniques observés dans le sous-ensemble de patients testés avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR étaient comparables à ceux observés chez l'ensemble de la population de l'étude.

Les résultats d'efficacité générale sont résumés dans le Tableau 14.

**Tableau 14. Bénéfices cliniques des patients testés avec le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR au sein de la population de l'essai clinique IFUM**

Paramètre	Population <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+, n = 87	Population CTA+, n = 106
<b>Taux de réponse objective (TRO) par BICR</b>		
Nombre de réponses (N)	42	53
TRO, % (IC 95 %)	48,3 (38,1-58,6)	50,0 (40,6-59,4)
Durée moyenne de réponse (mois)	6,9 (5,6-11,4)	6,0 (5,6-11,1)
<b>Taux de réponse objective (TRO) par les enquêteurs</b>		
Nombre de réponses (N)	62	74
TRO, % (IC 95 %)	71,3 (61,0-79,7)	69,8 (60,5-77,7)
Durée moyenne de réponse (mois)	8,3 (7,2-11,3)	8,3 (7,6-11,3)

**BICR** : Blinded independent central review ; **IC** : intervalle de confiance ; **CTA** : Clinical Trial Assay.  
**Remarque** : Kit+ indique les résultats positifs pour les délétions dans l'exon 19 et L8585R/L861Q/G719X.

---

Étant donné que le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR n'a pas été utilisé pour sélectionner les patients pour l'essai clinique IFUM, des analyses supplémentaires d'efficacité ont été conduites pour prendre en compte les patients qui n'étaient pas inclus dans l'essai car ils avaient été testés négatifs par le CTA mais auraient pu être testés positifs par le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (c.-à-d. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA-), ainsi que les patients qui ont participé à l'essai mais dont les résultats n'étaient pas valides lors du retest à l'aide du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (c.-à-d. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit inconnu/CTA+). Les résultats issus de toutes les analyses hypothétiques étaient généralement similaires à ceux effectués lors de l'analyse primaire de l'efficacité.

# Références














1. Pao, W. and Miller, V.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2556.
2. Johnson, B.E. and Jaenne, P.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **65**, 7525.
3. Inoue, A., et al. (2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3340.
4. Asahina, H., et al. (2006) A Phase II study of gefitinib as a first-line therapy for advanced non-small cell lung cancers with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations. 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta, 2-6 juin 2006. *J. Clin. Oncol.* **24** (18S) (Suppl), Abstr 13014.
5. Paz-Ares, L. et al. A prospective phase II trial of erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with mutations in the tyrosine kinase (TK) domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta, 2-6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* **24** (18S) (Suppl), Abstr 7020.
6. Kobayashi, K., et al. (2008) First-line gefitinib for poor PS patients with EGFR mutations. 44th Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago, 31 May-3 June 2008. *J. Clin. Oncol.* **26** (15S) (Suppl), Abstr 8070.
7. Sequist, L.V., et al. (2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring somatic EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.* **15**, 2442.
8. Porta, R. et al. (2008) Erlotinib customization based on epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in stage IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p). *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl), abstr 8038.

- 
9. Jaene, P.A. and Johnson, B.E. (2006) Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4416s.
  10. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* **17**, 804.
  11. Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.
  12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline*, 1st ed. CLSI Document EP-17A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).



# Symboles

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

Symbole	Définition du symbole
 <N>	Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions
	À utiliser avant
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Numéro de matériel
	Conserver à l’abri de la lumière
	Code article international (Global Trade Item Number, GTIN)
	Représentant agréé
<b>R<sub>n</sub></b>	R désigne une révision des instructions d’utilisation (manuel) et n représente le numéro de révision
	Limite de température
	Fabricant
	Consultez le mode d’emploi
	Attention

# Annexe A : Protocole manuel du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR

Cette section contient des instructions d'utilisation du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR avec le logiciel Rotor-Gene Q series version 2.3 en mode ouvert (sans utiliser le logiciel Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package).

## Informations générales

- Pour connaître le matériel nécessaire, consulter la section « Matériel nécessaire, mais non fourni », page 15.
- Pour des instructions détaillées sur la préparation et la disposition des échantillons, voir « Protocole : Évaluation de l'échantillon », page 22, et « Protocole : Détection des mutations EGFR », page 36.
- Veiller à ce que les paramètres de cycle soient corrects avant le début de chaque analyse.

## Protocole : Création d'un profil de température

Avant de commencer, créer un profil de température pour l'analyse du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Les paramètres de cycle sont les mêmes pour l'évaluation de l'échantillon d'ADN et la détection des mutations EGFR.

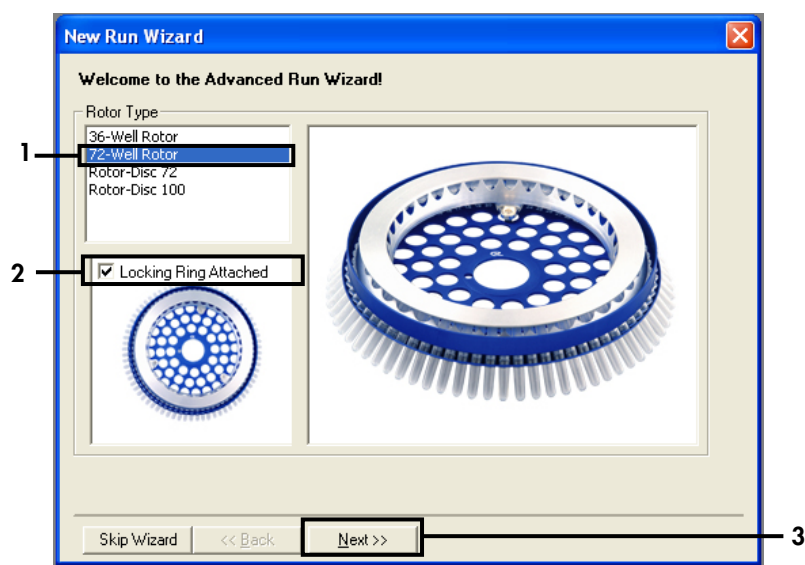
### Procédure

Les paramètres de cycle sont repris dans le Tableau 15.

**Tableau 15. Profil de température**

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

1. Double-cliquer sur l'icône du logiciel Rotor-Gene Q series 2.3 sur le bureau de l'ordinateur connecté à l'instrument Rotor-Gene Q MDx.
2. Pour créer un nouveau modèle, sélectionner « Empty Run » (analyse vide) puis cliquer sur « New » (nouvelle) pour ouvrir le « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse).
3. Sélectionner « 72-Well Rotor » (rotor 72 puits) comme type de rotor. Confirmer la bonne fixation de la bague de fermeture en cochant la case « Locking Ring Attached » (bague de fermeture fixée). Cliquer sur « Next » (suivant) (figure 20).



**Figure 20. Boîte de dialogue « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse).** 1 = « Rotor Type » (type de rotor), 2 = case « Locking Ring Attached » (bague de fermeture fixée), 3 = « Next » (suivant).

4. Saisir le nom de l'opérateur. Ajouter toutes les remarques et définir le volume réactionnel sur 25. S'assurer que « Sample Layout » (disposition d'échantillon) affiche « 1, 2, 3... ». Cliquer sur « Next » (suivant) (figure 21).

**New Run Wizard**

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator :

Notes :

Reaction Volume (µL):

Sample Layout :

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

**Figure 21. Entrer le nom de l'opérateur et les volumes réactionnels.** 1 = champ « Operator » (opérateur) et champ « Notes » (remarques), 2 = champ « Reaction Volume » (volume réactionnel) et champ « Sample Layout » (disposition d'échantillon), 3 = « Next » (suivant).

5. Cliquer sur « Edit Profile » (modifier profil) dans la boîte de dialogue « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse) (figure 22) puis vérifier les paramètres de l'analyse conformément aux informations contenues dans les étapes suivantes.

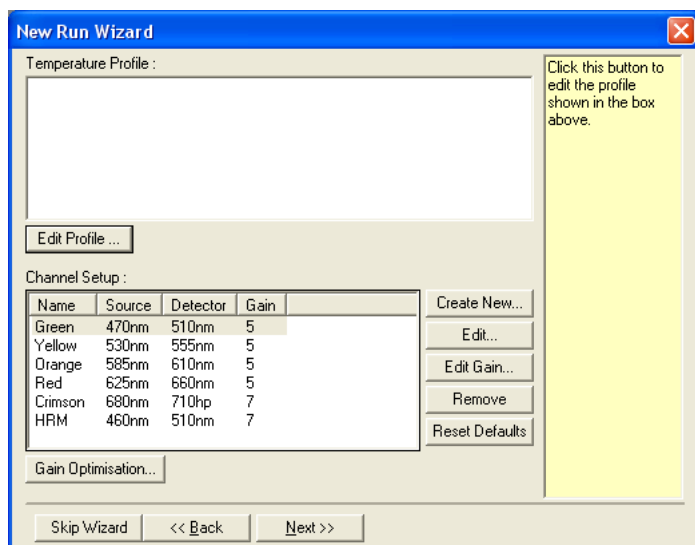


Figure 22. « Edit Profile » (modification du profil) dans l'assistant « New Run Wizard » (nouvelle analyse).

6. Cliquer sur le bouton « Insert after » (insérer après) puis sélectionner « New Hold at Temperature » (nouvelle température d'attente) (figure 23).

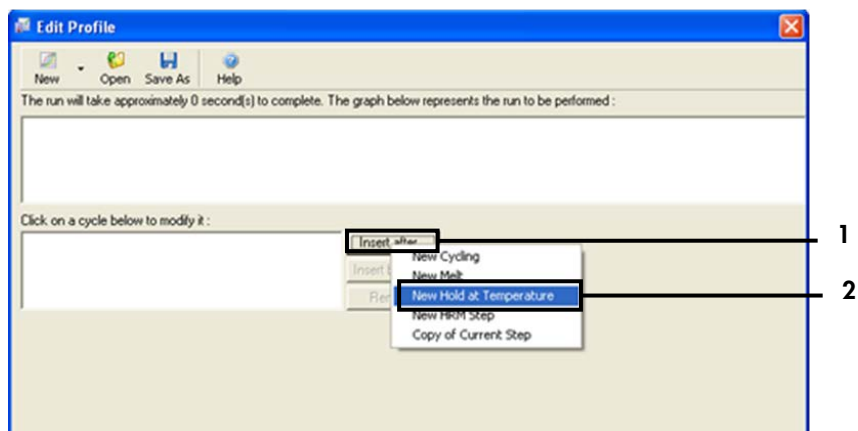
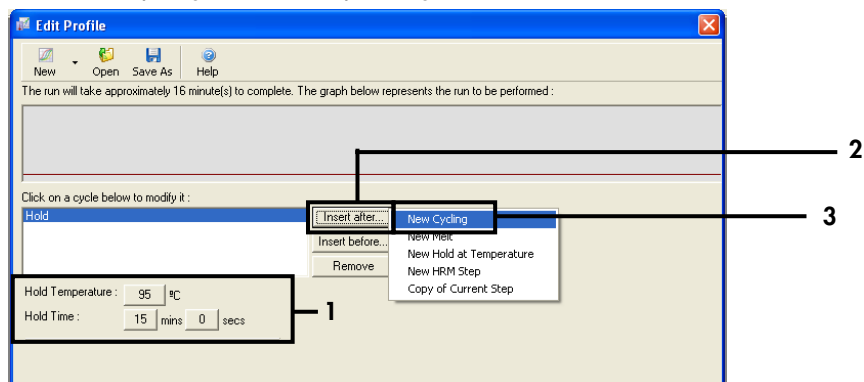


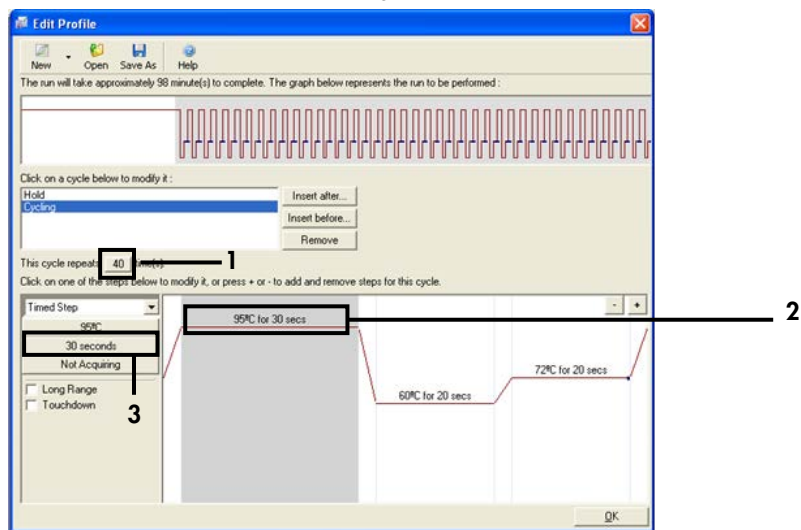
Figure 23. Insertion d'une étape d'incubation initiale. 1 = « Insert after » (insérer après), 2 = « New Hold at Temperature » (nouvelle température d'attente).

7. Régler « Hold Temperature » (température d'attente) sur 95 °C et « Hold Time » (temps d'attente) sur 15 min 0 sec. Cliquer sur « Insert After » (insérer après) puis sélectionner « New Cycling » (nouveau cycle) (figure 24).



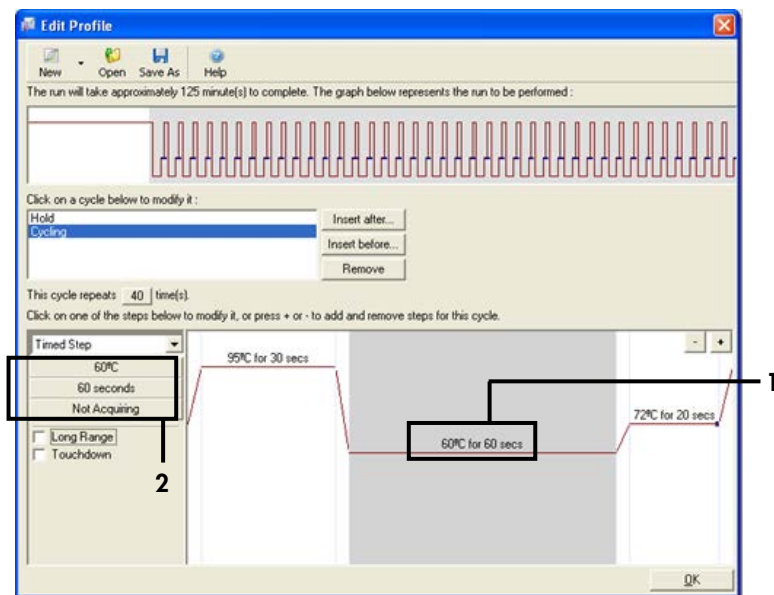
**Figure 24. Étape d'incubation initiale à 95 °C.** 1 = « Hold Temperature » (température d'attente) et « Hold Time » (temps d'attente), 2 = « Insert after » (insérer après), 3 = « New Cycling » (nouveau cycle).

8. Régler le nombre de répétitions de cycles sur 40. Sélectionner la première étape et régler sur 95 °C et sur 30 secondes (figure 25).



**Figure 25. Étape du cycle à 95 °C.** 1 = case de répétition de cycles, 2 = paramètre de température pour l'étape 1, 3 = paramètre de temps pour l'étape 1.

9. Mettre en surbrillance la seconde étape et régler sur « 60 °C pour 60 secs » (60 °C pour 60 secondes). Autoriser l'acquisition de données lors de cette étape en sélectionnant le bouton « Not Acquiring » (pas d'acquisition) (figure 26).



**Figure 26. Étape du cycle à 60 °C.** (1 = paramètres de temps et de température pour l'étape 2, 2 = bouton « Not Acquiring »).

10. Régler « Green » (vert) et « Yellow » (jaune) comme « Acquiring Channels » (canaux d'acquisition) en sélectionnant le bouton « > » pour transférer ces canaux depuis la liste « Available Channels » (canaux disponibles). Cliquer sur « OK » (figure 27).

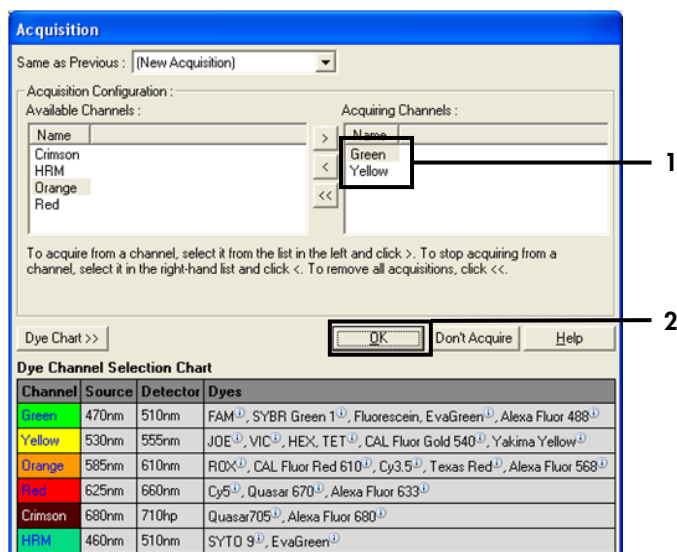


Figure 27. Acquisition à l'étape du cycle à 60 °C. 1 = canaux sélectionnés, 2 = bouton « OK ».

11. Mettre la troisième étape en surbrillance et la supprimer en cliquant sur « - ». Cliquer sur « OK » (figure 28).

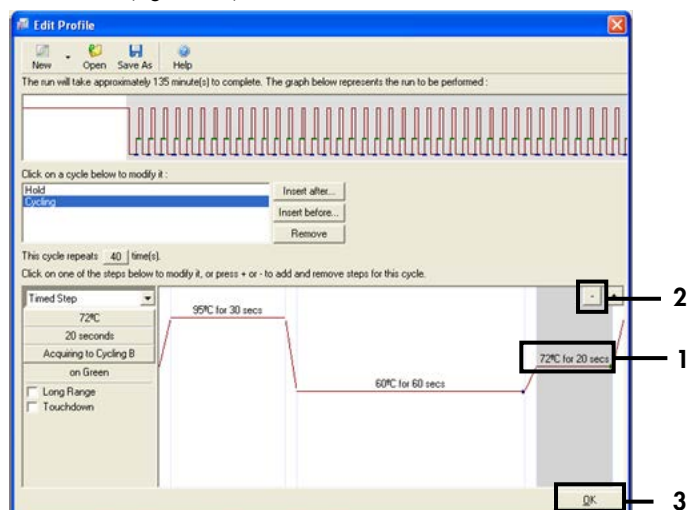


Figure 28. Suppression de l'étape supplémentaire 1 = troisième étape, 2 = bouton de suppression, 3 = bouton « OK ».



12. Dans la boîte de dialogue suivante, cliquer sur « Gain Optimisation » (optimisation de l'augmentation) (figure 29).

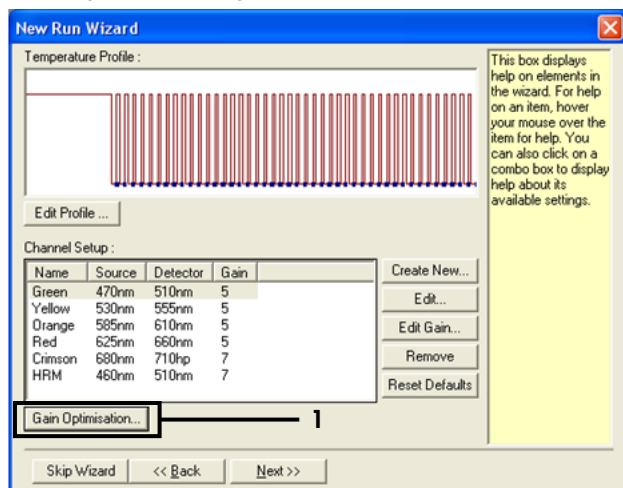
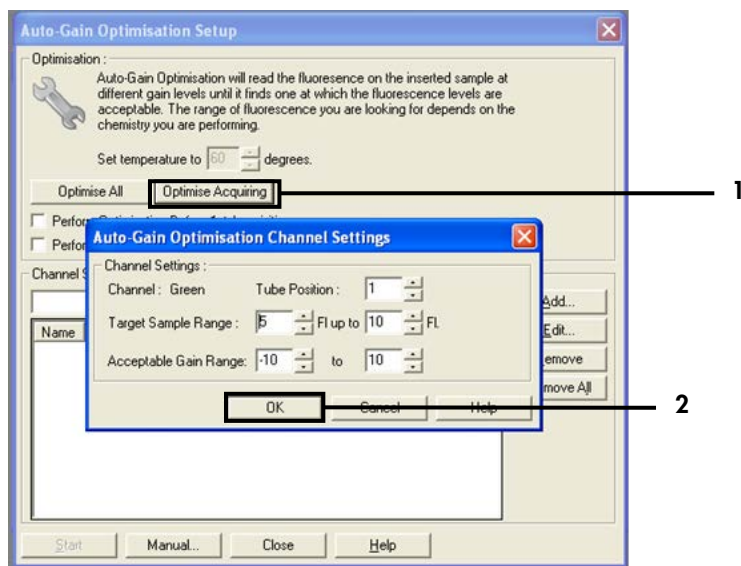


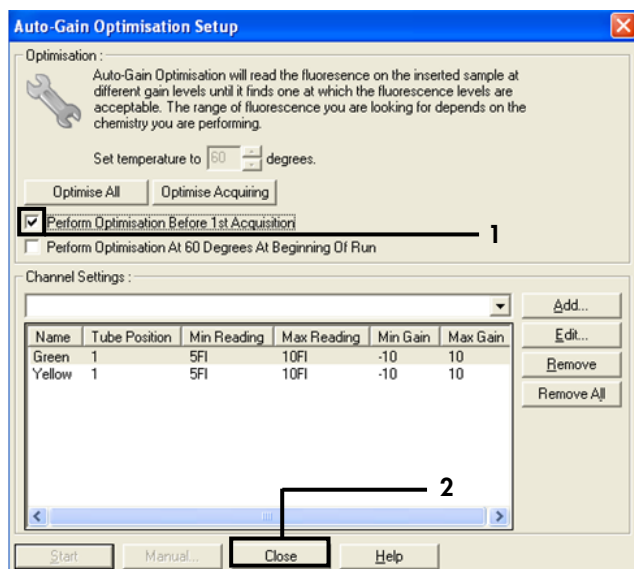
Figure 29. Optimisation de l'augmentation (1).

13. Cliquer sur « Optimise Acquiring » (optimiser l'acquisition). Les paramètres des canaux sont affichés pour chaque canal. Accepter ces valeurs par défaut en cliquant sur « OK » pour les deux canaux (figure 30).



**Figure 30. Optimisation automatique de l'augmentation pour le canal vert** 1 = « Optimise Acquiring » (optimiser l'acquisition), 2 = « OK ».

14. Cocher la case « Perform Optimisation before 1st Acquisition » (effectuer optimisation avant 1<sup>ère</sup> acquisition) puis cliquer sur « Close » (fermer) pour retourner dans l'assistant (figure 31).



**Figure 31. Sélection des canaux vert et jaune.** 1 = case « Perform Optimisation Before 1st Acquisition » (effectuer optimisation avant 1<sup>ère</sup> acquisition), 2 = « Close » (fermer).

15. Cliquer sur « Next » (suivant) (figure 32) pour sauvegarder le modèle du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (fichier \*.ret) dans un emplacement approprié en sélectionnant « Save Template » (sauvegarder modèle).

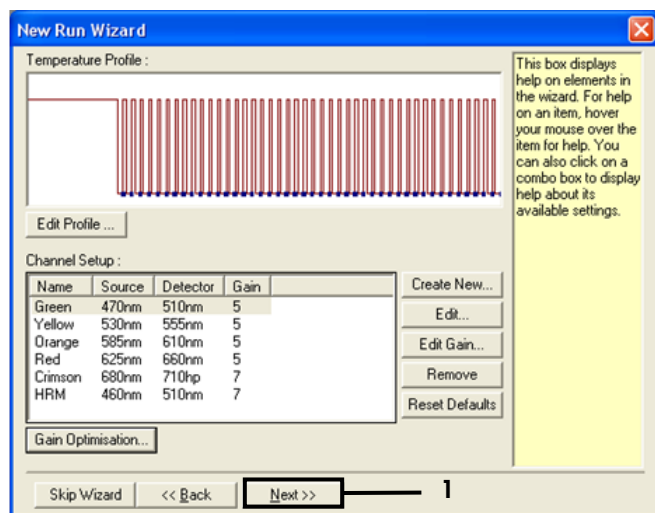


Figure 32. « Next » (suivant) (1).

# Procédure (manuelle)

## Protocole : Évaluation de l'échantillon (manuelle)

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

- Préparer les échantillons comme décrit à la section « Protocole : Évaluation de l'échantillon », page 22, jusqu'à l'étape 11.
- Configurer l'analyse PCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx comme décrit à la section « Protocole : *Configuration* Rotor-Gene Q du kit theascreen EGFR RGQ PCR », page 86.
- Une fois l'analyse terminée, analyser les données conformément aux instructions de la section « Analyse des données d'évaluation de l'échantillon », page 92.

## Protocole : Détection des mutations EGFR (manuelle)

- Une fois l'évaluation de l'échantillon réussie, ce dernier peut être testé pour la détection des mutations EGFR.
- Préparer les échantillons comme décrit à la section « Protocole : détection de la mutation EGFR » à la page 36, jusqu'à l'étape 11.
- Configurer l'analyse PCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx comme décrit à la section « Protocole : *Configuration* Rotor-Gene Q du kit theascreen EGFR RGQ PCR », page 86.
- Une fois l'analyse terminée, analyser les données conformément aux instructions de la section « Analyse des données de détection des mutations EGFR », page 94.

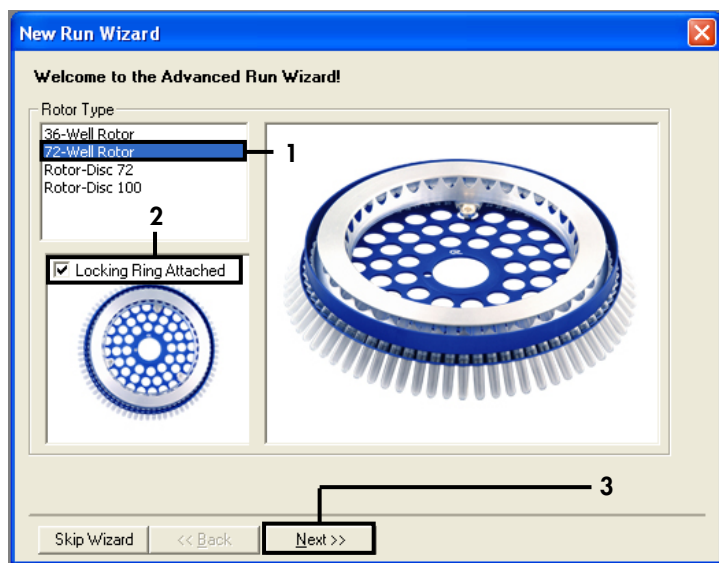
## Protocole : Configuration Rotor-Gene Q du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR

### Procédure

1. Ouvrir le logiciel Rotor-Gene Q series (2.3) et ouvrir le profil de température approprié du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (fichier \*.ret).

Pour obtenir les instructions de création du profil de température et vérifier les paramètres de l'analyse, voir « Protocole : Création d'un profil de température », page 74.

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



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

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

**New Run Wizard**

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator :  — 1

Notes :  — 2

Reaction Volume (µL):  — 3

Sample Layout :  — 4

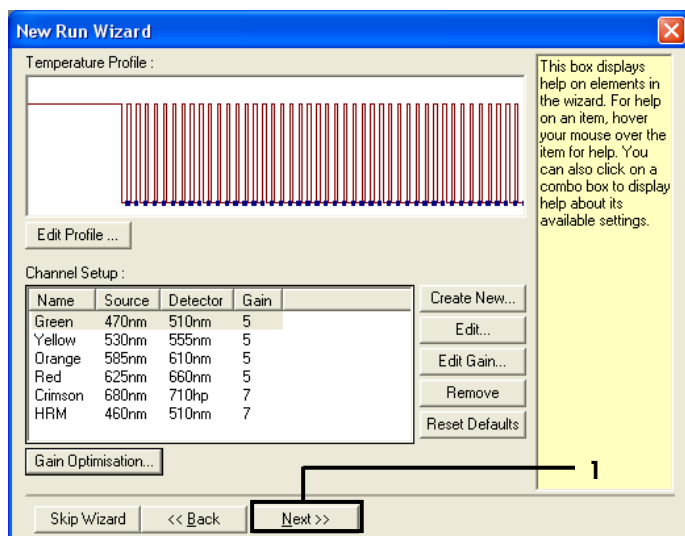
5

Skip Wizard << Back Next >>

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

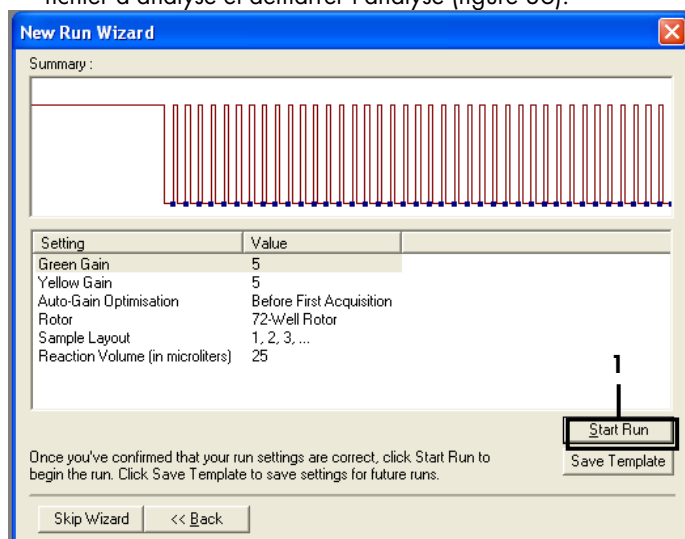
**Figure 34. Écran « New Run Wizard » (assistant nouvelle analyse)** 1 = champ « Operator » (opérateur), 2 = champ « Notes » (remarques), 3 = champs « Reaction Volume » (volume réactionnel), 4 = champ « Sample Layout » (disposition d'échantillon), 5 = « Next » (suivant).

4. La fenêtre suivante permet de modifier le profil de température. (Aucune modification n'est nécessaire car le profil a été créé conformément aux instructions figurant dans la section « Protocole : Création d'un profil de température », page 74). Cliquer sur « Next » (Figure 35).



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

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



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



5. Une fois l'analyse démarrée, une nouvelle fenêtre s'ouvre. Elle permet de saisir le nom des échantillons immédiatement ou de cliquer sur « Finish » (terminer) pour les entrer plus tard en sélectionnant « Sample » (échantillon) lors de l'analyse ou une fois celle-ci terminée.
  6. Le fait de cliquer sur « Finish and Lock Samples » (terminer et verrouiller les échantillons) empêche toute modification du nom des échantillons. L'utilisateur doit être particulièrement vigilant lors de la saisie des noms d'échantillon pour garantir l'analyse des échantillons appropriés.
- Remarque :** lors de l'attribution des noms, les champs des tubes vides doivent être laissés vierges dans la colonne « Name » (nom).
7. Une fois l'analyse terminée, analyser les données conformément aux sections « Analyse des données d'évaluation de l'échantillon », page 92 ou « Analyse des données de détection des mutations EGFR », page 94.
  8. Si des rapports de quantification sont nécessaires, cliquer sur l'icône « Reports » (rapports) dans la barre d'outils du fichier d'analyse Rotor-Gene Q.
  9. Dans le navigateur de rapports, cliquer sur « Cycling A Green » (cycle A vert) (page 1) dans « Report Categories » (catégories de rapports) (figure 37).

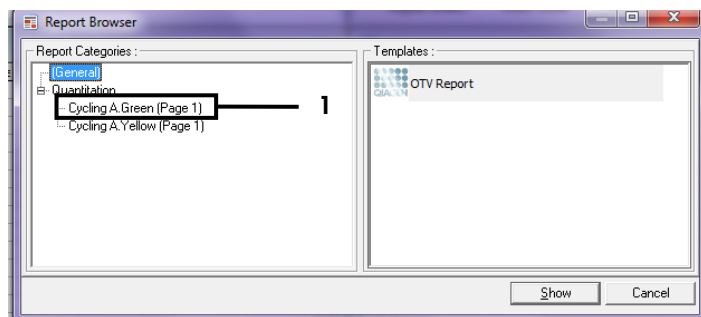
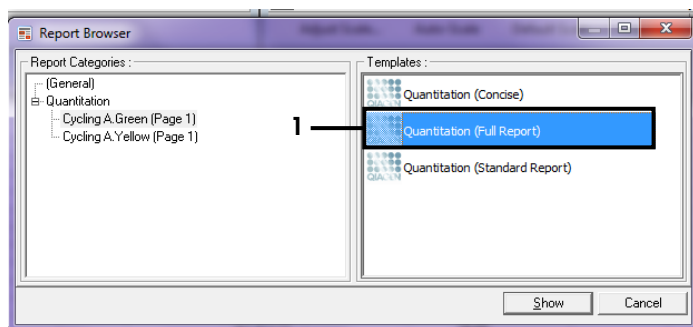


Figure 37. Navigateur de rapports (1 = « Cycling A. Green (Page 1) » (cycle A vert)).

10. Sélectionner « Quantitation (Full Report) » (quantification, rapport complet) sous « Templates » (modèles) (Figure 38).



**Figure 38. Rapport de quantification (rapport complet) (1).**

11. Cliquer sur « Show » (afficher) pour générer le rapport.
12. Cliquer sur « Save As » (enregistrer sous) pour en sauvegarder une version électronique.
13. Répéter l'opération pour « Cycling A Yellow (Page 1) » (cycle A jaune).

# Interprétation des résultats (manuelle)

Après l'analyse du kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (pour l'évaluation de l'échantillon d'ADN ou l'analyse des mutations EGFR), analyser les données conformément aux procédures suivantes :

- Paramètres logiciels d'analyse
- Analyse de l'évaluation de l'échantillon d'ADN (manuelle)  
**Remarque** : voir le Tableau 4, page 26, pour la disposition des tubes
- Analyse de la détection des mutations EGFR (manuelle)  
**Remarque** : voir le Tableau 7, page 39, pour la disposition des tubes

## Paramètres d'analyse du logiciel

1. Ouvrir le fichier d'analyse approprié (\*.rex) à l'aide du logiciel Rotor-Gene Q series, version 2.3.
2. Si les échantillons n'ont pas été nommés avant l'analyse, cliquer sur « Edit Samples » (modifier échantillons).
3. Insérer le nom des échantillons dans la colonne « Name » (nom).  
**Remarque** : les noms des tubes vides doivent être laissés vierges.
4. Cliquer sur « Analysis » (analyse). Sur la page de l'analyse, cliquer sur « Cycling A, Yellow » (cycle A, jaune) pour vérifier le canal jaune (HEX).
5. Cliquer sur « Named On » (nommé).  
**Remarque** : cela empêche les tubes vides de figurer dans l'analyse.
6. Sélectionner « Dynamic tube » (tube dynamique).
7. Sélectionner « Slope correct » (pente correcte).
8. Sélectionner « Linear Scale » (échelle linéaire).

9. Sélectionner « Take Off Adj. » (ajustement cycle) et saisir les valeurs 15.01 dans le champ supérieur « If take off point was calculated before cycle » (si le point d'ajustement cycle a été calculé avant le cycle) et 20.01 dans le champ inférieur « then use the following cycle and take off point » (utiliser le cycle et le point d'ajustement suivants).
10. Régler le seuil sur 0,02 puis vérifier les valeurs  $C_T$  du canal jaune (HEX).
11. Sur la page de l'analyse, cliquer sur « Cycling A. Green » (cycle A vert) pour afficher le canal vert (FAM).
12. Sélectionner « Named On » (nommé).
13. Sélectionner « Dynamic tube » (tube dynamique).
14. Sélectionner « Slope correct » (pente correcte).
15. Sélectionner « Linear Scale » (échelle linéaire).
16. Sélectionner « Take Off Adj. » (ajustement cycle) et saisir les valeurs 15.01 dans le champ supérieur « If take off point was calculated before cycle » (si le point d'ajustement cycle a été calculé avant le cycle) et 20.01 dans le champ inférieur « then use the following cycle and take off point » (utiliser le cycle et le point d'ajustement suivants).
17. Régler le seuil sur 0,075 puis vérifier les valeurs  $C_T$  du canal vert (FAM).

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

Après l'évaluation de l'échantillon d'ADN, consulter « Paramètres d'analyse du logiciel », page 91, et analyser les données comme suit. (Voir le Tableau 4, page 26, pour la disposition des tubes.)

## Exécuter l'analyse de contrôle

### Contrôle négatif

Pour garantir l'absence de contamination du modèle, le NTC ne doit pas générer une valeur  $C_T$  inférieure à 40 dans le canal vert (FAM).

Pour garantir le bon paramétrage de l'analyse, le NTC doit présenter une amplification de 29,85 à 35,84 dans le canal jaune (HEX). Les valeurs spécifiées comprennent et sont comprises dans ces valeurs.

### Contrôle positif

Le contrôle positif EGFR doit donner une valeur  $C_T$  comprise entre 28,13 et 34,59 dans le canal vert (FAM). Une valeur se trouvant en dehors de cet intervalle indique un problème de configuration du test. L'analyse a échoué.

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

## Analyse des échantillons

Si les contrôles pour l'évaluation de l'échantillon d'ADN sont valides, l'analyse peut avoir lieu. La valeur  $C_T$  de contrôle pour un échantillon doit être comprise entre 23,70 et 31,10 dans le canal vert (FAM). Si la valeur  $C_T$  de l'échantillon se trouve en dehors de cet intervalle, les critères suivants sont utilisés.

- $C_T$  de test de contrôle de l'échantillon  $< 23,70$

Les échantillons avec un  $C_T$  de contrôle inférieur à 23,70 (forte concentration d'ADN) surchargeront les tests de mutation et doivent être dilués. Pour détecter chaque mutation à un faible niveau, les échantillons surconcentrés doivent être dilués afin d'être compris dans l'intervalle de  $C_T$  de 23,70 à 31,10. La dilution de l'ADN d'échantillon augmente la valeur  $C_T$  (une dilution de 1:1 augmente la valeur  $C_T$  de 1,0 approximativement). Diluer les échantillons en utilisant l'eau fournie dans le kit (eau pour dilution [Dil.]).

- $C_T$  de test de contrôle de l'échantillon  $> 31,10$

Une nouvelle extraction des échantillons présentant un  $C_T > 31,10$  dans le canal vert (FAM) est recommandée. La quantité d'ADN matrice initiale n'est pas suffisante pour détecter toutes les mutations EGFR aux valeurs seuil indiquées pour le test.

## Analyse des données de détection des mutations EGFR

Procéder à une évaluation de l'échantillon d'ADN avant de soumettre l'échantillon au test de détections des mutations EGFR (voir « Analyse des données d'évaluation de l'échantillon », page 92).

Après la détection des mutations EGFR, consulter « Paramètres d'analyse du logiciel », page 91, et analyser les données comme suit. (Voir le Tableau 7, page 39, pour la disposition des tubes.)

## Exécuter l'analyse de contrôle

Consulter l'organigramme de la figure 39 relatif à l'exécution de l'analyse de contrôle.

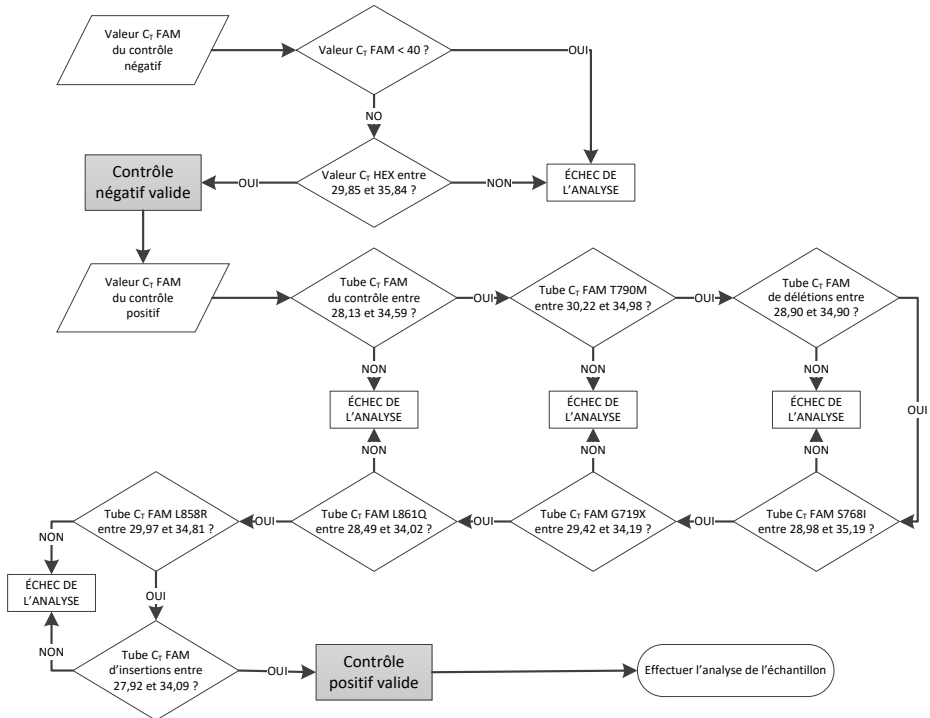


Figure 39. Organigramme de l'analyse des contrôles pour la détection des mutations EGFR.

### Contrôle négatif

Pour garantir l'absence de contamination du modèle, le NTC de chacun des tests de mutations EGFR ne doit pas générer une valeur  $C_T$  inférieure à 40 dans le canal vert (FAM).

Pour garantir le bon paramétrage de l'analyse, le NTC doit présenter une amplification de 29,85 à 35,84 dans le canal jaune (HEX). Les valeurs spécifiées comprennent et sont comprises dans ces valeurs.

### Contrôle positif

Pour chacun des tests de mutations EGFR, le contrôle positif EGFR doit donner une valeur  $C_T$  contenue dans l'intervalle indiqué au Tableau 16 dans le canal vert (FAM). Une valeur se trouvant en dehors de cet intervalle indique un problème de configuration du test. L'analyse a échoué.

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

**Tableau 16. Intervalles de  $C_T$  acceptables pour les contrôles positifs de réaction (test de détection des mutations EGFR)**

Mélange réactionnel	Échantillon	Canal	Intervalle $C_T$
Contrôle	PC	Vert	28,13 à 34,59
T790M	PC	Vert	30,22 à 34,98
Délétions	PC	Vert	28,90 à 34,90
L858R	PC	Vert	29,97 à 34,81
L861Q	PC	Vert	28,49 à 34,02
G719X	PC	Vert	29,42 à 34,19
S768I	PC	Vert	28,98 à 35,19
Insertions	PC	Vert	27,92 à 34,09



## Analyse des échantillons - Valeur $C_T$ du canal vert (FAM) du contrôle de l'échantillon

Si les contrôles positif et négatif pour la détection des mutations EGFR sont valides, la détection des mutations EGFR dans les échantillons peut avoir lieu.

La valeur  $C_T$  du contrôle pour un échantillon dans le canal vert (FAM) doit être comprise entre 23,70 et 31,10. (Voir le tableau 7, page 39, pour la disposition des tubes.)

Si la valeur  $C_T$  du contrôle de l'échantillon se trouve en dehors de cet intervalle, les critères suivants sont utilisés.

- $C_T$  de test de contrôle de l'échantillon < 23,70

Les échantillons avec un  $C_T$  de contrôle inférieur à 23,70 (forte concentration d'ADN) surchargeront les tests de mutation et doivent être dilués. Pour détecter chaque mutation à un faible niveau, les échantillons surconcentrés doivent être dilués afin d'être compris dans l'intervalle de  $C_T$  de 23,70 à 31,10. La dilution de l'ADN d'échantillon augmente la valeur  $C_T$  (une dilution de 1:1 augmente la valeur  $C_T$  de 1,0 approximativement). Diluer les échantillons en utilisant l'eau fournie dans le kit (eau pour dilution [Dil.]).

- $C_T$  de test de contrôle de l'échantillon > 31,10

Une nouvelle extraction des échantillons présentant un  $C_T$  > 31,10 dans le canal vert (FAM) est recommandée. La quantité d'ADN matrice initiale n'est pas suffisante pour détecter toutes les mutations EGFR aux valeurs seuil indiquées pour le test.

Consulter l'organigramme de la figure 40 relatif à l'analyse des échantillons pour la détection des mutations EGFR.

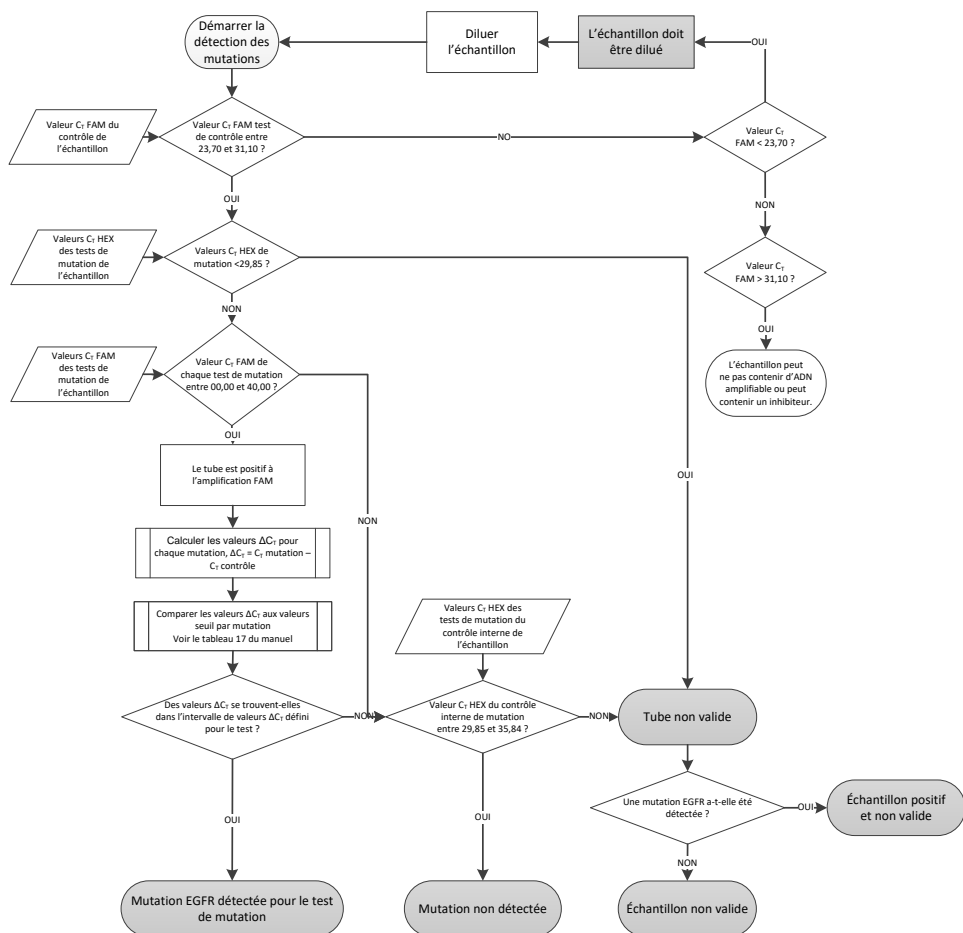


Figure 40. Organigramme de l'analyse des échantillons pour la détection des mutations EGFR.

## Analyse des échantillons - Valeur $C_T$ du canal jaune (HEX) du contrôle interne de l'échantillon

Consulter l'organigramme de la figure 40 relatif à l'analyse des échantillons pour la détection des mutations EGFR.

Tous les tubes de chaque échantillon doivent être analysés. Vérifier que chaque tube génère un signal HEX compris entre 29,85 et 35,84 à partir du contrôle interne dans le canal jaune (HEX). Trois résultats sont possibles.

- Si le  $C_T$  du contrôle interne est inférieur à l'intervalle spécifié ( $< 29,85$ ) pour tout test de mutation, le résultat est invalide pour l'amplification du canal jaune (HEX). L'amplification du canal jaune (HEX) pour ce tube n'est pas valide.
- Si le  $C_T$  du contrôle interne se trouve dans l'intervalle spécifié (29,85 à 35,84), le résultat est positif pour l'amplification du canal jaune (HEX).  
L'amplification du canal jaune (HEX) pour ce tube est valide.
- Si le  $C_T$  du contrôle interne est supérieur à l'intervalle spécifié ( $> 35,84$ ), le résultat est négatif pour l'amplification du canal jaune (HEX).

S'il y a une amplification dans le canal vert (FAM) et que la valeur  $\Delta C_T$  pour cette réaction est inférieure ou égale à la valeur seuil du test pour ce tube, l'amplification du canal jaune (HEX) est valide. S'il n'y a pas d'amplification dans le canal vert (FAM) pour ce tube ou qu'une valeur  $\Delta C_T$  est supérieure à la valeur seuil du test, l'amplification du canal jaune (HEX) n'est pas valide.

L'amplification du contrôle interne dans le canal jaune (HEX) peut échouer en raison de l'inhibition de la PCR. La dilution de l'échantillon peut réduire l'effet des inhibiteurs. Noter que cette action dilue également l'ADN cible dans l'échantillon. Diluer les échantillons en utilisant l'eau fournie dans le kit (eau pour dilution [Dil.]).

Analyse des échantillons - Valeur C<sub>T</sub> du canal vert (FAM) des tests de mutation de l'échantillon

Les valeurs du canal vert (FAM) des sept mélanges réactionnels de mutations EGFR doivent être vérifiées par rapport aux valeurs énumérées dans le Tableau 17. Les valeurs spécifiées comprennent et sont comprises dans les valeurs affichées. (Voir le Tableau 7, page 39, pour la disposition des tubes.)

Tableau 17. Valeurs acceptables pour les réactions de mutations EGFR dans le canal vert (FAM) (test de détection des mutations EGFR)

Test	Intervalle C <sub>T</sub>	Seuil (ΔC <sub>T</sub> )
T790M	0,00 à 40,00	≤ 7,40
Délétions	0,00 à 40,00	≤ 8,00
L858R	0,00 à 40,00	≤ 8,90
L861Q	0,00 à 40,00	≤ 8,90
G719X	0,00 à 40,00	≤ 8,90
S768I	0,00 à 40,00	≤ 8,90
Insertions	0,00 à 40,00	≤ 8,00

- Si la valeur C<sub>T</sub> du canal vert (FAM) pour l'échantillon est conforme à l'intervalle spécifié, l'échantillon est positif à l'amplification FAM.
- Si la valeur C<sub>T</sub> du canal vert (FAM) est supérieure à l'intervalle spécifié ou qu'il n'existe aucune amplification, l'échantillon est négatif à l'amplification FAM.

Calculer la valeur ΔC<sub>T</sub> de chaque tube de détection de mutations EGFR positif à l'amplification FAM comme suit, tout en s'assurant que les valeurs C<sub>T</sub> du test de contrôle et du test de mutation proviennent du même échantillon. (Voir le Tableau 7, page 39, pour la disposition des tubes.)

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

Comparer la valeur  $\Delta C_T$  de l'échantillon avec le point seuil du test en question (Tableau 17) en s'assurant que le point seuil correct est bien appliqué.

Le point seuil est le point au-dessus duquel un signal positif pour un test peut potentiellement provenir du signal de bruit de fond de l'amorce ARMS sur l'ADN de type sauvage. Si la valeur de  $\Delta C_T$  de l'échantillon est supérieure au point seuil pour un test, l'échantillon est classé comme négatif ou hors des limites de détection du kit pour ce test.

L'état de chaque réaction de mutation pour chacun des échantillons peut être l'un des états suivants :

- Mutation détectée
- Mutation non détectée
- Non valide

### **Mutation détectée**

L'amplification du canal vert (FAM) est positive et la valeur  $\Delta C_T$  est inférieure ou égale à la valeur seuil. Si plusieurs mutations sont détectées pour un échantillon, elles peuvent toutes être rapportées.

### **Mutation non détectée**

L'amplification du canal vert (FAM) est positive et la valeur  $\Delta C_T$  est supérieure à la valeur seuil.

L'amplification du canal vert (FAM) est négative et l'amplification du canal jaune (HEX) (contrôle interne) est positive.

---

## Non valide

L'amplification du canal jaune (HEX) (contrôle interne) est non valide.

L'amplification du canal vert (FAM) est négative et l'amplification du canal jaune (HEX) (contrôle interne) est négative.

**Remarque** : un échantillon peut être négatif à l'amplification du canal jaune (HEX) dans un tube mais positif à l'amplification du canal vert (FAM) dans un autre tube. Dans ce cas, un résultat « Mutation détectée » dans le second tube peut être considéré comme valide mais la mutation identifiée n'est peut-être pas la seule mutation possible de cet échantillon.

## Annexe B : Installation du logiciel *therascreen* EGFR CE Assay Package

Le kit *therascreen* EGFR RGQ PCR est conçu pour une utilisation avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx et un rotor à 72 puits. Le logiciel *therascreen* EGFR CE Assay Package est disponible séparément sur CD (n° de réf. 9023537). Le logiciel est composé des modèles « *therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template » et « *therascreen* EGFR CE Locked Template ».

**Remarque :** le logiciel *therascreen* EGFR CE Assay Package n'est compatible qu'avec le logiciel RotorGene Q series version 2.3. Vérifier que la bonne version du logiciel RotorGene Q series est installée avant de poursuivre l'installation du logiciel *therascreen* EGFR CE Assay Package. Si l'instrument Rotor-Gene Q MDx a été fourni avec une version logicielle antérieure, il est possible de le mettre à niveau facilement en téléchargeant la version 2.3 sur la page du produit RotorGene Q MDx, dans la section « Product Resources » (ressources produit) sous « Operating Software » (logiciel d'exploitation), se reporter à [www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources](http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources).

### Procédure

1. Commander le CD du logiciel *therascreen* EGFR CE Assay Package (n° de réf. 9023537).
2. Insérer le CD dans le lecteur de l'ordinateur connecté à l'instrument Rotor-Gene Q MDx.
3. Si le CQ se charge automatiquement, démarrer l'installation en double-cliquant sur le fichier *therascreen\_EGFR\_CE\_Assay\_Package\_3.0.5.exe*.  
Sinon, localiser et lancer ce fichier d'exécution à l'aide du navigateur de fichiers sur l'ordinateur connecté.
4. L'assistant d'installation du logiciel *therascreen* EGFR CE Assay Package s'ouvre. Cliquer sur « Next » (suivant) pour continuer (figure 41).

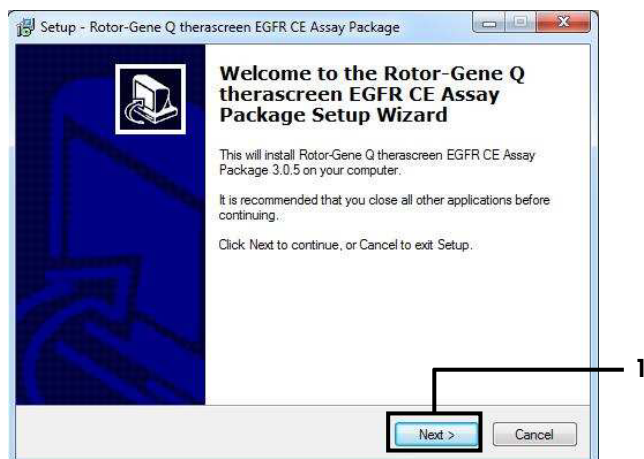


Figure 41. Boîte de dialogue de l'assistant d'installation (1 = « Next »).

5. Lire l'accord de licence dans la boîte de dialogue et accepter l'accord en cochant la case « I accept the agreement » (j'accepte l'accord). Cliquer sur « Next » (suivant) pour continuer (Figure 42).

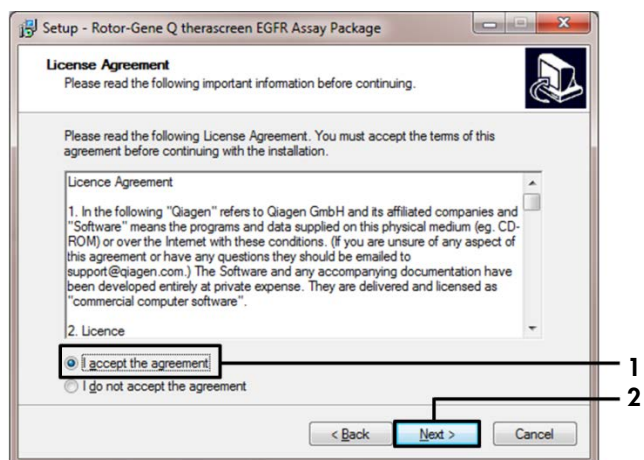


Figure 42. Boîte de dialogue « License Agreement » (accord de licence). 1 = « I accept the agreement », 2 = « Next ».



6. L'installation démarre automatiquement. Une fois l'installation terminée, une boîte de dialogue finale s'ouvre. Cliquer sur « Finish » (terminer) pour quitter (Figure 43).

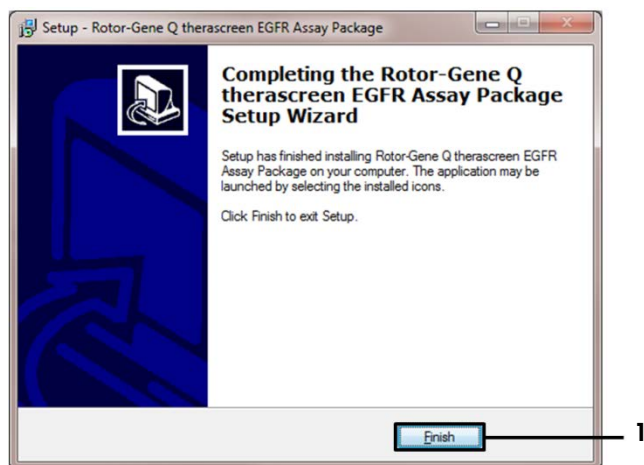


Figure 43. Fin de l'installation (1 = « Finish » (terminer)).

7. Redémarrer l'ordinateur.

Les raccourcis des modèles « *therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template » et « *therascreen* EGFR CE Locked Template » s'affichent automatiquement sur le bureau (Figure 44).

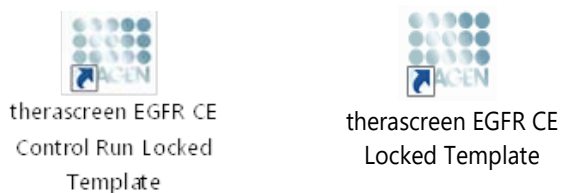


Figure 44. Icônes des modèles EGFR CE Control Run Locked Template et EGFR CE Locked Template.

---

## Coordonnées

Pour une assistance technique et plus d'informations, consulter notre Centre d'assistance technique à **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)**, appeler le 00800-22-44-6000 ou contacter l'un des départements du service technique ou l'un des distributeurs locaux de QIAGEN (voir la quatrième de couverture ou visiter le site **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).

# Pour commander

Produit	Contenu	N° réf.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Pour 24 réactions : test de contrôle, 7 tests de mutation, contrôle positif, <i>Taq</i> ADN polymérase, eau pour contrôle négatif (NTC) et eau pour dilution d'échantillon	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package CD	Package de protocole logiciel destiné à une utilisation avec le kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR et l'instrument QIAGEN Rotor-Gene Q MDx	9023537
<b>QIAamp DNA FFPE Tissue Kit</b>		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pour 50 préparations d'ADN : colonnes QIAamp MinElute®, protéinase K, tampons et tubes de prélèvement (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pour 50 préparations : 50 colonnes QIAamp MinElute, protéinase K, tampons et tubes de prélèvement (2 ml)	56404
<b>Rotor-Gene Q MDx et accessoires</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Thermocycleur pour PCR en temps réel et analyseur « High Resolution Melt » (fusion haute résolution) à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : garantie 1 an pièces, main d'œuvre, installation et formation comprises	9002033

Produit	Contenu	N° réf.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Thermocycleur pour PCR en temps réel et analyseur « High Resolution Melt » (fusion haute résolution) à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : garantie 1 an pièces et main-d'œuvre comprises, installation et formation non comprises.	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Bloc en aluminium pour préparation de réaction manuelle avec pipette à canal unique dans des tubes de 72 x 0,1 mL	9018901
Tubes en barrettes et capuchons, 0,1 ml (250)	250 barrettes de 4 tubes et capuchons pour 1000 réactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 barrettes de 4 tubes et bouchons pour 10 000 réactions	981106

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)** ou peuvent être demandés auprès des services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

# Historique des révisions du manuel

Document	Modifications	Date
HB-1909-002	Mise à jour des valeurs LOD (tableau 11) dans « Caractéristiques de performances ».	Juin 2015
HB-1909-003	Mises à jour des messages générés par le logiciel (tableau 8). Mises à jour des données de reproductibilité du test (tableau 12). Ajout des résultats cliniques de IRESSA dans « Caractéristiques de performances ».	Août 2016
HB-1909-004	Changement des durées de stockage de préparation pour clarifier la durée de décongélation et la durée totale dans « Conditions de conservation » et les tableaux 2 et 5. Mise à jour de la figure 40. Organigramme de l'analyse des échantillons pour la détection des mutations EGFR. Ajout d'informations de commandes concernant le kit QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue (réf. 60404)	Mars 2018
HB-1909-005	Ajout de Représentant agréé (page de couverture). Mise à jour de la section « Symboles ».	Janvier 2019

Marques déposées : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); GIOTRIF® (Boehringer Ingelheim), IRESSA® (AstraZeneca Group)

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

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

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

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis avec ce produit et ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans le panel. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce panel avec tout autre composant non fourni dans ce panel, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce panel et/ou sa ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce panel et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du panel consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de 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](http://www.qiagen.com).

HB-1909-005 01-2019 © 2019 QIAGEN, tous droits réservés.

---

**Remarques**

---

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