

Octobre 2019

Manuel du *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit



Version 2

IVD

Pour utilisation diagnostique in vitro

Pour utilisation avec les appareils Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



REF

874111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, ALLEMAGNE

R6 **MAT**

1119191FR

Sommaire

| | |
|--|----|
| Utilisation prévue | 5 |
| Résumé et explication | 6 |
| Principe de la procédure | 9 |
| Matériel fourni | 13 |
| Contenu du kit | 13 |
| Matériel nécessaire mais non fourni | 14 |
| Avertissements et précautions | 16 |
| Précautions générales | 16 |
| Stockage et manipulation des réactifs | 18 |
| Conditions d'expédition | 18 |
| Conditions de stockage | 18 |
| Stockage et manipulation des prélèvements | 20 |
| Procédure | 21 |
| Extraction et préparation de l'ADN | 21 |
| Protocole : évaluation des échantillons | 22 |
| Protocole : détection des mutations d'EGFR | 35 |
| Interprétation des résultats (automatisée) | 48 |
| Indicateurs d'erreurs du Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package | 50 |
| Guide de dépannage | 54 |
| Contrôle qualité | 55 |
| Limitations | 55 |

| | |
|--|----|
| Caractéristiques de performances..... | 57 |
| Performances analytiques | 57 |
| Limite du blanc (Limit of Blank, LoB), intervalle de validité et valeurs seuils..... | 57 |
| Effet de la quantité d'ADN introduit sur les valeurs de ΔC_T | 58 |
| Réactivité croisée | 59 |
| Exactitude : comparaison avec la méthode d'analyse de référence..... | 59 |
| Valeurs de la limite de détection (Limit of Detection, LoD)..... | 60 |
| Interférence | 62 |
| Reproductibilité | 63 |
| Performances cliniques | 67 |
| Données des résultats cliniques : GIOTRIF® | 67 |
| Données des résultats cliniques : IRESSA® | 69 |
| Références..... | 72 |
| Symboles..... | 74 |
| Annexe A : protocole manuel du <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit..... | 75 |
| Informations générales..... | 75 |
| Protocole : création d'un profil de température | 75 |
| Procédure (manuelle) | 87 |
| Protocole : évaluation (manuelle) des échantillons | 87 |
| Protocole : détection (manuelle) des mutations d'EGFR..... | 87 |
| Protocole : configuration du Rotor-Gene Q pour le <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit..... | 88 |
| Interprétation des résultats (manuelle) | 94 |
| Paramètres d'analyse du logiciel | 94 |
| Analyse des données d'évaluation des échantillons..... | 96 |

| | |
|---|-----|
| Analyse des données de détection des mutations d'EGFR | 97 |
| Annexe B : installation du <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package | 106 |
| Coordonnées | 109 |
| Informations pour commander | 110 |
| Historique des révisions du document..... | 112 |

Utilisation prévue

Le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit est un test diagnostique *in vitro* pour la détection de 29 mutations somatiques dans le gène EGFR. Il fournit une évaluation qualitative du statut mutationnel des échantillons tumoraux prélevés chez les patients avec cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC).

Les résultats ont pour objectif d'aider le clinicien à identifier les patients avec CPNPC qui peuvent bénéficier d'un traitement par des inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR.

Le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit permet de tester les échantillons d'ADN extraits de tissus tumoraux fixés au formol et inclus en paraffine (Formalin-Fixed, Paraffin Embedded, FFPE) prélevés sur les patients avec CPNPC. Il est conçu pour une utilisation sur les appareils Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Il doit être utilisé par un personnel qualifié, dans un environnement de laboratoire professionnel.

Le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit est conçu pour une utilisation diagnostique *in vitro*.

Résumé et explication

Les mutations dans l'oncogène EGFR sont présentes dans certains cancers humains (1, 2). Il existe une corrélation entre la présence de ces mutations et la réponse à certains traitements par des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) chez les patients avec CPNPC (3–8). Dans la population générale des patients avec CPNPC, ces mutations dans 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 Taïwan (1, 2, 9).

Le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit est un kit prêt à l'emploi permettant la détection de 29 mutations dans l'oncogène EGFR à l'aide de l'amplification en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR) sur les appareils Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Grâce aux technologies Scorpions® (10) et ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (11), le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit permet de détecter 29 mutations dans les exons 18, 19, 20 et 21 de l'oncogène EGFR (tableau 1) en présence d'un fond d'ADN génomique de type sauvage. En résumé :

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

Les méthodes utilisées étant hautement sélectives, elles permettent, en fonction de la quantité totale d'ADN présente, de détecter un faible pourcentage d'ADN mutant sur un 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 | COSMIC* ID | 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/>.

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 1. Liste des mutations et des identifiants COSMIC

| Exon | Mutation | COSMIC* ID | 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/>.

** Les mutations COSM6254 (2239_2253del15) et COSM12369(2240_2254del15) entraînent la délétion de 15 paires de bases dans la séquence du gène EGFR. La même séquence finale est obtenue avec ces deux mutations et il est impossible de distinguer l'une de l'autre. Par conséquent, la mutation COSM6254 (2239_2253del15) a été supprimée de la dernière version de COSMIC (v83) et ces deux mutations sont maintenant référencées avec l'identifiant COSM12369 (2240_2254del15). Cette modification est conforme à la recommandation de la HGVS préconisant de représenter la délétion située la plus en 3'. Le test thetascreen EGFR ne permet pas de distinguer entre les 19 différentes mutations par délétion et tout résultat positif à une délétion est nommé « Deletions » (Délétions). Ce changement affecte uniquement la documentation et n'a aucune influence sur le kit ni sur sa capacité à détecter les mutations individuelles.

Principe de la procédure

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

ARMS

L'amplification spécifique d'allèle ou de mutation s'effectue à l'aide d'ARMS. La *Taq* ADN polymérase (*Taq*) distingue de façon efficace entre un appariement et un mésappariement à l'extrémité 3' d'une amorce de PCR. Les séquences aux mutations spécifiques sont amplifiées sélectivement, même dans les échantillons où la majorité des séquences ne porte pas la mutation. Lorsque l'amorce est entièrement appariée, l'amplification s'effectue avec une efficacité maximale. Lorsque la base en 3' est mésappariée, seule une faible amplification de fond se produit.

Sondes Scorpions

La détection de l'amplification s'effectue à l'aide de la technologie Scorpions. Les molécules Scorpions sont bifonctionnelles et contiennent une amorce de PCR liée par liaison covalente à une sonde. Le fluorophore de cette sonde interagit avec un quencher, qui est également incorporé à la sonde et réduit 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 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit :

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

Tous les mélanges réactionnels contiennent les réactifs pour détecter les cibles marquées par la carboxyfluorescéine (FAM™) et un contrôle interne marqué par l'hexachlorofluorescéine (HEX™). Le contrôle interne permet de détecter la présence d'inhibiteurs pouvant entraîner des faux négatifs. L'amplification FAM peut dépasser l'amplification du 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 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit comprend une procédure en deux étapes. Lors de la première étape, le test de contrôle est effectué afin d'évaluer l'ADN d'EGFR amplifiable total d'un échantillon. Lors de la seconde étape, les tests de mutation et 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 d'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 Scorpion ont été conçues de façon à éviter tout polymorphisme connu du gène EGFR.

Tests de mutation

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

Contrôles

Remarque : tous les cycles expérimentaux doivent inclure des contrôles positifs et négatifs.

Contrôle positif

Chaque cycle doit contenir un contrôle positif dans les tubes 1 à 8. Le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit contient un contrôle positif (Positive Control, PC) d'EGFR à utiliser en tant que matrice dans la réaction du contrôle positif. Les résultats du contrôle positif sont évalués pour garantir que les performances du kit sont conformes aux critères d'acceptation donnés.

Contrôle négatif

Chaque cycle doit contenir un contrôle négatif (contrôle sans matrice [No-Template Control, NTC]) dans les tubes 9 à 16. Le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit contient de l'eau à utiliser en tant que « matrice » pour le NTC. Le NTC est utilisé pour détecter toute contamination potentielle durant la configuration du cycle 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 (CI) 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. Le CI fait appel à une séquence cible d'oligonucléotides sans rapport avec le gène EGFR, à une amorce non marquée et à une amorce Scorpions marquée par HEX afin de la distinguer des amorces Scorpions marquées par FAM dans les mélanges réactionnels de contrôle et de mutation. L'amplification FAM peut surpasser l'amplification du CI, de sorte que la valeur de C_T du CI (HEX) peut se trouver en dehors de l'intervalle spécifié. Les résultats FAM demeurent valides pour ces échantillons.

Évaluation des échantillons

Il est vivement recommandé d'utiliser le mélange réactionnel de contrôle (tube CTRL) fourni avec le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 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 comme « matrice » pour le NTC.

Remarque : l'évaluation de l'ADN doit être basée sur la PCR et peut différer de la quantification basée sur les mesures d'absorbance. Du 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 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Plateforme et logiciel

Le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit est conçu spécifiquement pour une utilisation avec les appareils Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. L'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM est programmé pour différents paramètres de cycles par le *therascreen* EGFR CE Assay Package.

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

Il est aussi possible d'utiliser le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit avec le logiciel Rotor-Gene Q version 2.3 en mode ouvert (c.-à-d. sans utiliser le Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package). Pour plus d'informations, voir Annexe A : protocole manuel du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Matériel fourni

Contenu du kit

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

Matériel nécessaire mais non fourni

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

Réactifs

- Kit d'extraction d'ADN (voir la section « Extraction et préparation de l'ADN »)

Consommables et équipement général de laboratoire

- Pipettes dédiées* (réglables) pour la préparation des échantillons
- Pipettes dédiées* (réglables) pour la préparation des master mix PCR
- Pipettes dédiées* (réglables) pour la distribution de l'ADN matrice
- Pointes de pipette avec filtres exemptes de DNase, de RNase et d'ADN (pour éviter les contaminations croisées, il est recommandé d'utiliser des pointes de pipette avec barrières antiaérosols)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, pour utilisation avec un 72-well rotor (référence catalogue 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 Tubes : bloc en aluminium pour préparation de réaction manuelle avec pipette monocanal (référence catalogue 9018901)
- Thermomixeur*, incubateur orbital chauffé*, bloc chauffant* ou bain-marie* capable d'incuber à 90 °C
- Centrifugeuse de paillasse* avec rotor pour tubes réactionnels de 2ml
- Agitateur vortex*

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

Équipement pour PCR

- Appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM avec canaux de fluorescence pour Cycling Green et Cycling Yellow (pour la détection de FAM et HEX, respectivement)* †
- Logiciel Rotor-Gene Q version 2.3
- CD du Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package version 3.0.5 (référence catalogue 9023537)

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

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

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

Avertissements et précautions

Pour utilisation diagnostique in vitro

Lors de la manipulation de produits chimiques, porter systématiquement une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF à l'adresse www.qiagen.com/safety, où il est possible de trouver, de consulter et d'imprimer les FDS de chaque kit et composant de kit QIAGEN.

Pour les informations de sécurité concernant l'appareil Rotor-Gene Q, consulter le manuel d'utilisation fourni avec celui-ci.

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

Précautions générales

Veiller à toujours prêter attention aux points suivants.

- Ce test est conçu uniquement pour une utilisation avec des prélèvements de tissus de CPNPC fixés au formol et inclus en paraffine.
- Conserver et extraire le matériel positif (prélèvements 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. Il est recommandé d'utiliser des pipettes individuelles 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 distincte de celle où est réalisée l'addition de la matrice. Les tubes du Rotor-Gene Q ne doivent pas être ouverts une fois le cycle de PCR terminé. Cela permet d'éviter toute contamination du laboratoire avec les produits obtenus après PCR.

- Tous les produits chimiques et biologiques sont potentiellement dangereux. Les prélèvements et échantillons sont potentiellement infectieux et doivent être traités comme du matériel présentant un risque biologique.
- Les réactifs du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ont été dilués de manière optimale. Ne pas effectuer de dilution supplémentaire des réactifs, car cela peut entraîner une baisse des performances. Ne pas utiliser de volumes réactionnels (mélange réactionnel plus échantillon) inférieurs à 25 µl, car cela augmente le risque de faux négatifs.
- Tous les réactifs fournis dans le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans le même *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Ne pas remplacer les réactifs du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, y compris par les réactifs d'autres *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits, car cela peut affecter les performances.
- Utiliser uniquement la *Taq* ADN polymérase (tube *Taq*) fournie dans le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Ne pas la remplacer par de la *Taq* ADN polymérase d'autres kits du même type ou d'un type différent ni par de la *Taq* ADN polymérase d'un autre fournisseur.
- Ne pas utiliser de composants périmés ou stockés dans de mauvaises conditions.

Remarque : travailler soigneusement afin de s'assurer que les tests d'échantillons sont corrects, en veillant tout particulièrement à éviter les erreurs d'entrées d'échantillons, de chargement et de pipetage.

Remarque : les réactifs sont validés pour une préparation manuelle. Dans le cadre d'une méthode automatisée, le nombre de réactions possibles peut être diminué en raison du volume de réactif nécessaire pour remplir les « volumes morts » sur ces appareils.

Stockage et manipulation des réactifs

Conditions d'expédition

Le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit est expédié sur un lit de carboglace et doit être congelé à la réception. Si le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit arrive non congelé, si l'emballage externe a été ouvert au cours du transport ou si le colis ne contient pas la notice d'emballage, le manuel ou les réactifs, contacter les Services techniques de QIAGEN ou son distributeur local (voir quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com).

Conditions de stockage

Le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit doit être stocké dès réception à une température comprise entre -30 et -15 °C dans un congélateur à température constante et à l'abri de la lumière. Les sondes Scorpions (comme toutes les molécules marquées en fluorescence) doivent être protégées de la lumière pour éviter tout photoblanchiment ou toute perte de performances. Lorsqu'il est stocké dans les conditions de conservation spécifiées, le kit est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

Une fois ouverts, les réactifs peuvent être conservés dans leur emballage d'origine à une température comprise entre -30 et -15 °C pendant 12 mois, ou jusqu'à la date d'expiration indiquée si elle survient avant. Éviter de répéter les cycles de congélation-décongélation. 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 heure au minimum et 4,5 heures au maximum. Une fois les réactifs prêts à l'utilisation, les PCR peuvent être préparées et les tubes du Rotor-Gene Q contenant les master mix et l'échantillon d'ADN doivent être chargés immédiatement sur un appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. La durée totale, depuis le début de la préparation de la PCR jusqu'au démarrage du cycle, 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 (2 à 8 °C)

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

Remarque : pour garantir une activité et des performances optimales, les sondes Scorpions (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 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, les échantillons doivent être regroupés par lot. Si les échantillons sont testés individuellement, il faut utiliser plus de réactifs. Cela entraîne la diminution du nombre d'échantillons pouvant être testés avec le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Stockage et manipulation des prélèvements

Remarque : tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Le matériau d'échantillon doit être constitué d'ADN génomique humain extrait de tissu FFPE. Les prélèvements doivent être transportés conformément aux normes méthodologiques en pathologie pour garantir leur bonne qualité.

Les échantillons tumoraux ne sont pas homogènes et les données d'un échantillon tumoral peuvent ne pas correspondre avec celles d'autres coupes de la même tumeur. Les échantillons tumoraux peuvent également contenir du tissu non tumoral. L'ADN de tissu non tumoral n'est pas susceptible de contenir de mutations détectées par le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

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 dans du formol neutre tamponné à 10 % 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.
- Demander à un professionnel expérimenté (p. ex. un pathologiste) d'évaluer une coupe colorée à l'hématoxyline-éosine (H&E) 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 (15 à 25 °C). Les lames peuvent être conservées à température ambiante pendant 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 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (référence catalogue 60404). S'il est disponible dans votre pays, utiliser ce kit pour la préparation de l'ADN. En cas d'utilisation du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (référence catalogue 56404) de même fonction, procéder à l'extraction de l'ADN conformément aux instructions du manuel en prenant en compte les points suivants :

- Ne pas utiliser la QIAGEN Deparaffinization Solution. Pour la déparaffinisation, utiliser uniquement la méthode au xylène ou à l'éthanol décrite dans le *manuel du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Veiller à utiliser de l'éthanol de qualité biologie moléculaire * pour toutes les étapes requises.
- 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 dans le *manuel du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) 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 dans le *manuel du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) 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 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Les échantillons doivent être élués dans 120 μl de tampon d'éluion (ATE) du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (étape 20 dans le *manuel du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*).
- L'ADN génomique peut être conservé entre 2 et $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1 semaine après l'extraction ou entre -30 et $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à 8 semaines avant l'utilisation.

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

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

Protocole : évaluation des échantillons

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 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 theascreen EGFR RGQ PCR Kit*.

Points importants avant de commencer

- Avant de commencer la procédure, lire la section « Précautions générales ».
- Prendre le temps de se familiariser avec l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM avant de démarrer le protocole. Consulter le manuel d'utilisation de l'appareil.
- Ne pas faire passer dans l'agitateur la *Taq* ni tout mélange contenant de la *Taq*, car cela peut désactiver cette enzyme.
- Pipetter la *Taq* en disposant la pointe de la pipette juste sous la surface du liquide afin d'éviter qu'elle se recouvre d'une quantité excessive d'enzyme.
- Le mélange réactionnel de contrôle disponible permet d'évaluer un maximum de 24 échantillons.

Actions à effectuer avant de commencer

- Vérifier que le Rotor-Gene Q *therascreen EGFR CE Assay Package* est installé avant la première utilisation de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (voir Annexe B : installation du *therascreen EGFR CE Assay Package*).
- Avant chaque utilisation, veiller à décongeler complètement tous les réactifs pendant une durée comprise entre 1 heure et 4,5 heures à température ambiante (15 à 25 °C), à les mélanger 10 fois en les retournant, puis à les centrifuger brièvement afin que le contenu soit rassemblé au fond des tubes.
- Mélanger tous les échantillons en les retournant 10 fois et les centrifuger brièvement afin que le contenu soit rassemblé au fond des tubes.

- Veiller à ce que la *Taq* soit à température ambiante (15 à 25 °C) avant chaque utilisation. Centrifuger brièvement le tube afin que toute l'enzyme soit rassemblée au fond du tube.

Procédure

1. Décongeler le mélange réactionnel de contrôle (CTRL), l'eau exempte de nucléase pour contrôle sans matrice (No Template Control, NTC) et le contrôle positif (Positive Control, PC) EGFR à température ambiante (15 à 25 °C) pendant une durée comprise entre 1 et 4,5 heures.

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

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

| Durée minimale de décongélation | Durée maximale de décongélation | 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 du cycle de PCR sur l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Remarque : amener la *Taq* à température ambiante (15 à 25 °C) en même temps que les autres réactifs (voir la section « Stockage et manipulation des réactifs »). Centrifuger brièvement le tube afin que toute l'enzyme soit rassemblée 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 centrifuger brièvement afin que le contenu soit rassemblé au fond des tubes.

3. Préparer suffisamment de master mix de contrôle (mélange réactionnel de contrôle [CTRL] plus *Taq*) pour les échantillons d'ADN, une réaction avec le PC EGFR et une réaction avec le NTC conformément aux volumes indiqués dans le tableau 3. Inclure des réactifs pour un échantillon supplémentaire afin de disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR.

Remarque : le master mix contient tous les composants nécessaires pour la PCR, à l'exception de l'échantillon.

Tableau 3. Préparation du master mix du test de contrôle

| Composant | Volume |
|--|-------------------------------------|
| Mélange réactionnel de contrôle (CTRL) | $19,5 \mu\text{l} \times (n + 1) *$ |
| <i>Taq</i> ADN polymérase (<i>Taq</i>) | $0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$ |
| Volume total | 20 μl /réaction |

* n = nombre de réactions (échantillons plus contrôles). Préparer suffisamment de master mix pour 1 échantillon supplémentaire (n + 1) afin de disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR. La valeur de « n » ne doit pas dépasser 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. Homogénéiser doucement le master mix 10 fois par aspiration-refoulement avec la pipette. Placer le nombre approprié de tubes en barrettes dans le bloc de chargement conformément à la répartition indiquée dans le tableau 4. Ajouter immédiatement 20 μl de master mix dans chaque tube de PCR en barrette.

Les bouchons doivent rester dans le conteneur en plastique pendant 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. Répartition des tests d'évaluation des échantillons d'ADN dans le bloc de chargement.

Les nombres 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 | - | - | - | - | - | - |

- Ajouter immédiatement 5 µl d'eau pour NTC dans le tube en position 2 et fermer le tube.
- Ajouter 5 µl de chaque échantillon dans les tubes d'échantillons (positions 3 à 26) et fermer les tubes.
- Ajouter 5 µl de PC EGFR dans le tube en position 1 et fermer le tube.
Prendre soin d'éviter toute erreur de chargement ou de pipetage pour s'assurer d'effectuer correctement l'addition de NTC, des échantillons et de PC dans les tubes correspondants. Marquer le couvercle des tubes pour indiquer la direction de chargement des tubes dans l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Une fois tous les tubes de PCR fermés, vérifier visuellement les niveaux de remplissage des tubes d'échantillons pour garantir qu'un échantillon a été ajouté dans chacun d'entre eux.
- Retourner tous les tubes de PCR quatre fois pour homogénéiser les échantillons et les mélanges réactionnels.
- Placer les tubes de PCR en barrettes sur le rotor à 72 puits dans les positions appropriées, conformément à la répartition indiquée dans le tableau 4.
Si le rotor n'est pas complètement rempli, mettre des tubes vides fermés dans toutes les positions vacantes.
- Placer immédiatement le rotor à 72 puits dans l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Vérifier que la bague de verrouillage (un accessoire de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) est bien fixée au-dessus du rotor pour que les tubes ne bougent pas lors du cycle.

Remarque : en cas d'évaluation manuelle des échantillons, voir Annexe A : *protocole manuel du theascreen EGFR RGQ PCR Kit.*

12. Double-cliquer sur l'icône « *therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template » (Modèle verrouillé de cycle de contrôle du *therascreen* EGFR CE) sur le bureau de l'ordinateur connecté à l'appareil Rotor-Gene Q MDx pour lancer le logiciel Rotor-Gene Q (figure 1).



Figure 1. Icône « Modèle verrouillé du EGFR CE » pour le cycle de contrôle (évaluation des échantillons).

13. L'onglet « Setup » (Configuration) s'ouvre par défaut (figure 2). Veiller à ce que la bague de verrouillage soit correctement fixée et cocher la case Locking Ring Attached (Bague de verrouillage fixée). Fermer le capot de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

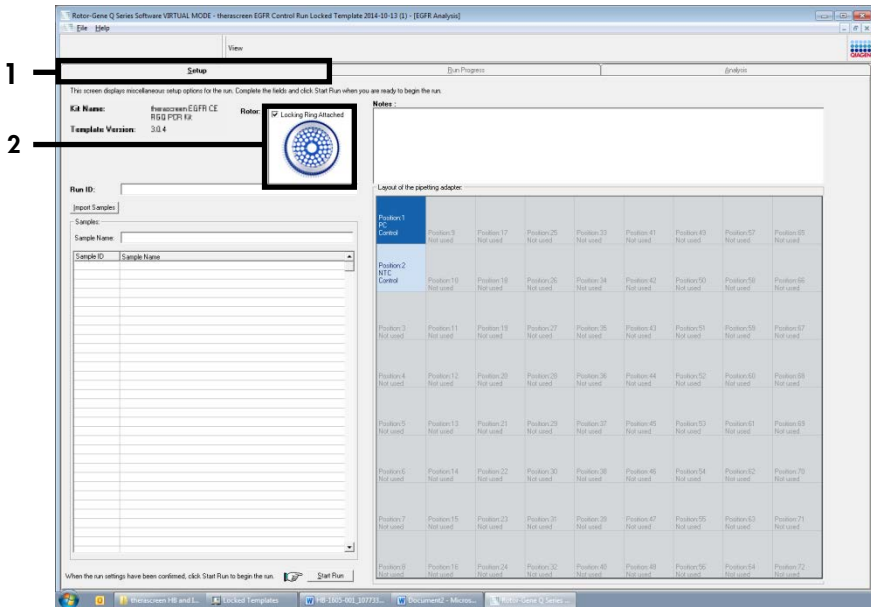


Figure 2. Onglet « Setup » (Configuration) (1) et case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage fixée) (2).

14. Saisir l'identifiant du cycle dans le champ Run ID (ID de cycle) conformément aux pratiques de votre laboratoire. Saisir le nom de l'échantillon dans le champ Sample Name (Nom d'échantillon) conformément aux pratiques de votre laboratoire et appuyer sur Return (Entrée).

Le nom de l'échantillon est alors ajouté à la liste d'échantillons en dessous et un « Sample ID » (ID d'échantillon) lui est attribué (1, 2, 3, etc.). En outre, le panneau « Layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipetage) sur la droite est réactualisé 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 d'échantillon Rotor-Gene Q) ou *.csv (valeurs séparées par des virgules) à l'aide de la fonction Import Samples (Importer des échantillons). Avec cette méthode, les noms d'échantillons sont automatiquement renseignés.

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

Remarque : les noms d'échantillons comportant plus de 8 caractères peuvent ne pas s'afficher entièrement dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipetage).

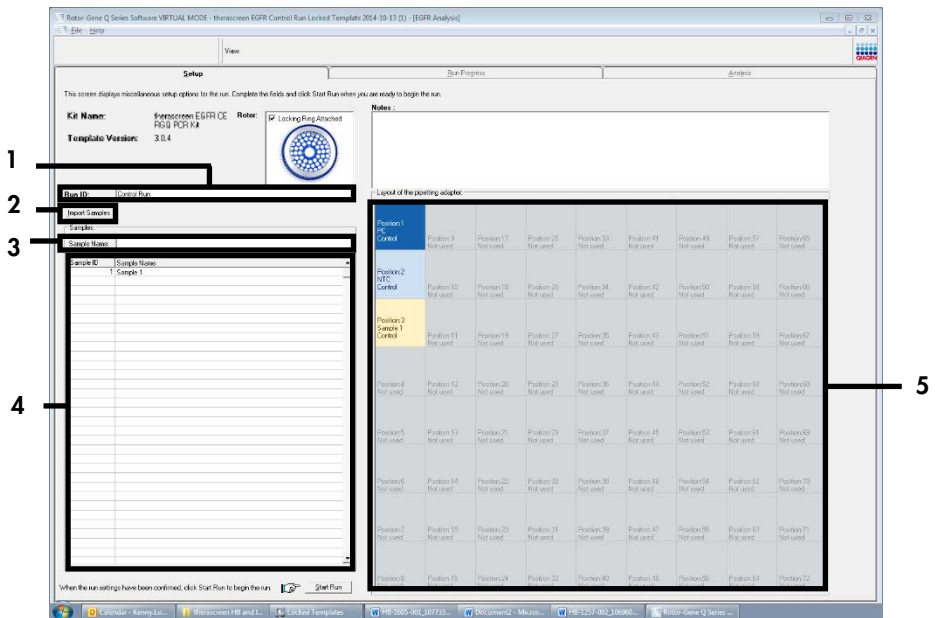


Figure 3. Saisie du « Run ID » (ID de cycle) et du « Sample Name » (Nom d'échantillon). 1 = champ « Run ID » (ID de cycle) ; 2 = panneau « Sample Import » (Importer des échantillons) ; 3 = champ « Sample Name » (Nom d'échantillon) ; 4 = Sample List (Liste des échantillons) ; 5 = panneau « layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipetage).

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 d'échantillon) dans la liste d'échantillons de sorte que l'échantillon sélectionné s'affiche dans le champ Sample Name (Nom d'échantillon) au-dessus. Modifier le nom de l'échantillon conformément aux pratiques de votre laboratoire et appuyer sur Return (Entrée) pour réactualiser le nom.

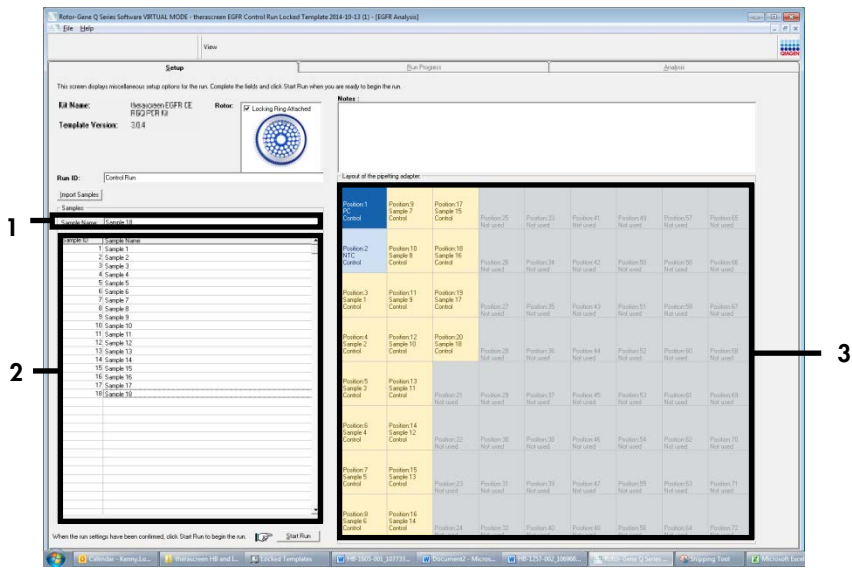


Figure 4. Saisie de nouveaux noms d'échantillons dans le champ « Sample Name » (Nom d'échantillon). 1 = champ « Sample Name » (Nom d'échantillon) ; 2 = Sample List (Liste des échantillons) ; 3 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipetage).

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 le cycle) (figure 5).

Remarque : si une position de rotor est inutilisée, un 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 fermés. Vérifier que toutes les positions inutilisées du rotor sont occupées par des tubes vides fermés et cliquer sur OK pour continuer. La fenêtre « Save As » (Enregistrer sous) s'ouvre.

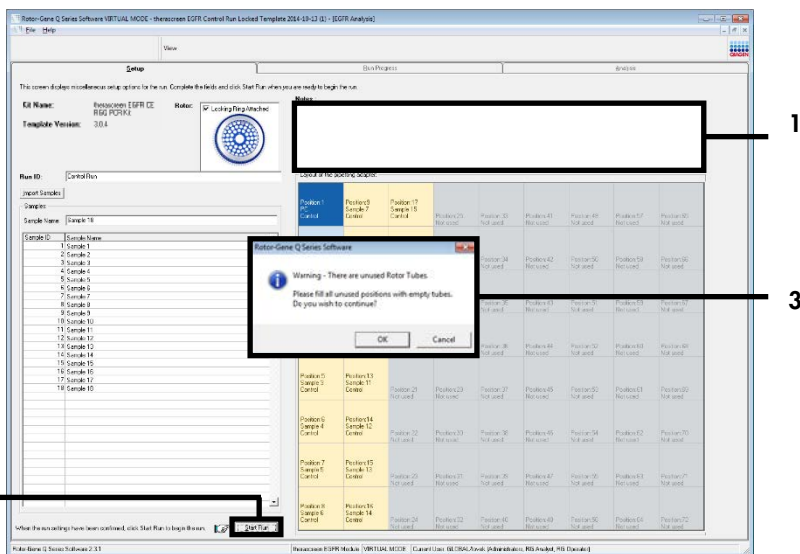


Figure 5. Champ « Notes » (1), bouton « Start Run » (Démarrer le cycle) (2) et Warning (Avertissement) concernant les positions de rotor inutilisées (3).

17. Choisir un nom de fichier approprié et enregistrer le cycle de PCR dans un fichier de cycle *.rex à l'emplacement sélectionné. Cliquer sur Save (Enregistrer) (figure 6).

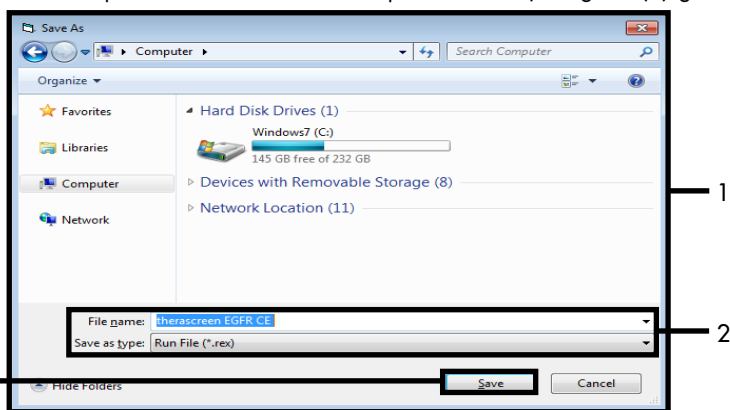


Figure 6. Fenêtre « Save As » (Enregistrer sous) (1), 2 = champs « File name » (Nom de fichier) et « Save as type » (Type de fichier) ; 3 = bouton « Save » (Enregistrer).

Le cycle de PCR démarre.

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

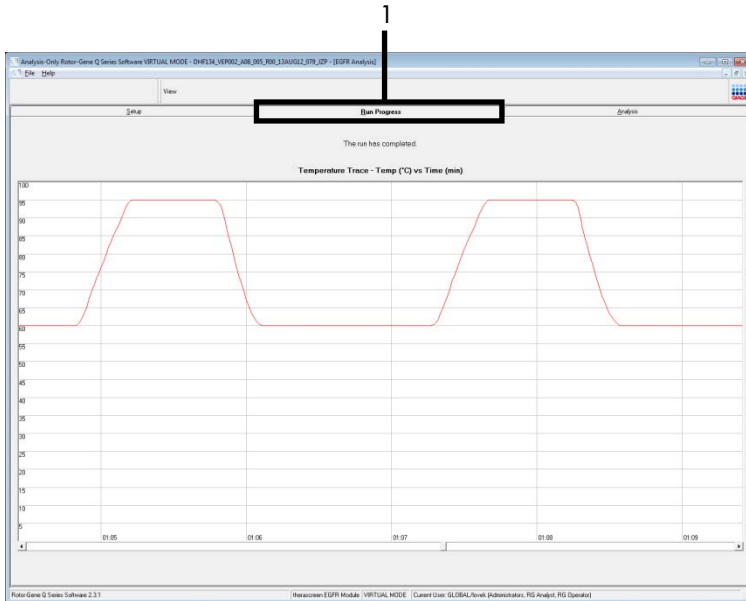


Figure 7. Onglet « Run Progress » (Progression du cycle) (1).

Remarque : à la fin du cycle, l'onglet « Analysis » (Analyse) s'ouvre. Si l'onglet « Analysis » (Analyse) ne s'ouvre pas, cliquer dessus (figure 8).

Remarque : la méthode de calcul est expliquée dans la section « Interprétation des résultats (automatisée) ».

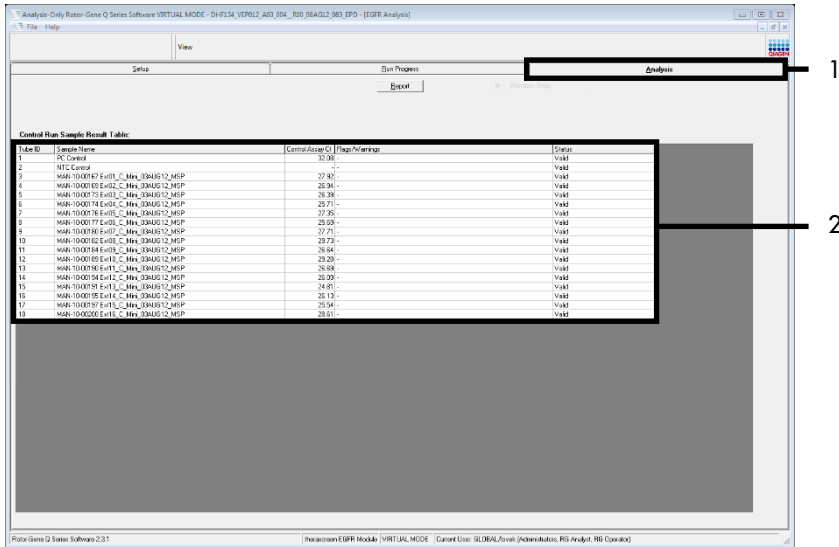


Figure 8. Onglet « Analysis » (Analyse) (1) et rapport de résultats (2 = « Control Run Sample Result Table » [Tableau des résultats des échantillons du cycle de contrôle]).

Les résultats de contrôle sont rapportés comme suit dans le tableau « Control Run Sample Result Table » (Tableau des résultats des échantillons du cycle de contrôle) (figure 8).

Contrôles de cycle (PC et NTC aux positions de tubes 1 et 2, respectivement). Si les résultats se trouvent dans des intervalles acceptables, ils sont affichés comme « Valid » (Valides). Dans le cas contraire, un résultat « Invalid » (Non valide) s’affiche.

Une valeur de C_T pour la réaction de contrôle d’échantillon $>31,10$ s’affiche comme « Invalide » (Non valide). La quantité d’ADN n’est pas suffisante pour l’analyse des mutations. Retester l’échantillon. Si la quantité d’ADN est toujours insuffisante, extraire davantage de tissu tumoral s’il est disponible.

Une valeur de C_T pour la réaction de contrôle d'échantillon $<23,70$ s'affiche comme « Invalide » (Non valide). La concentration d'ADN est trop élevée pour l'analyse des mutations. Diluer avec de l'eau exempte de nucléase pour dilution (Dil.) et réeffectuer le test. Diluer pour obtenir une valeur de C_T comprise entre 23,70 et 31,10. Une dilution 1:1 augmente la valeur de C_T de 1,0 environ.

Une valeur de C_T pour la réaction de contrôle d'échantillon comprise entre 23,70 et 31,10 ($23,70 \leq C_T \text{ du contrôle} \leq 31,10$) s'affiche comme « Valid » (Valide). La concentration d'ADN est adaptée à l'analyse des mutations.

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

18. Cliquer sur Report (Rapport) pour produire un fichier de rapport. La fenêtre « Report Browser » (Explorateur de rapports) s'ouvre. Sélectionner EGFR CE Analysis Report (Rapport d'analyse d'EGFR CE) sous « Templates » (Modèles), puis cliquer sur Show (Afficher) (figure 9).

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

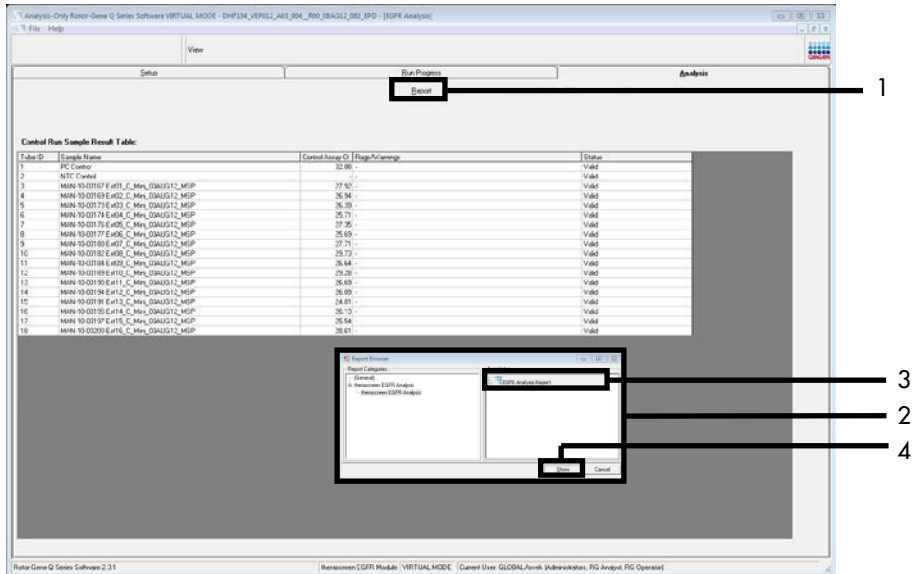


Figure 9. Sélection du modèle « EGFR CE Analysis Report » (Rapport d'analyse d'EGFR CE). 1 = « Report » (Rapport) ; 2 = fenêtre « Report Browser » (Explorateur de rapports) ; 3 = sélection « EGFR Analysis Report » (Rapport d'analyse d'EGFR) ; 4 = « Show » (Afficher).

Protocole : détection des mutations d'EGFR

Ce protocole est utilisé pour la détection des mutations d'EGFR. Une fois que l'évaluation de l'ADN d'un échantillon s'avère satisfaisante, celui-ci peut subir les tests de mutations d'EGFR à l'aide du logiciel automatisé.

Remarque : pour la détection manuelle des mutations, voir Annexe A : *protocole* manuel du *therascreen EGFR RGQ PCR Kit*.

Points importants avant de commencer

- Avant de commencer la procédure, lire la section « Précautions générales ».
- Prendre le temps de se familiariser avec l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM avant de démarrer le protocole. Consulter le manuel d'utilisation de l'appareil.
- Un échantillon est approprié pour les tests des mutations d'EGFR si le résultat de son test d'évaluation de l'ADN est satisfaisant.
- Pour une utilisation efficace du *therascreen EGFR RGQ PCR Kit*, les échantillons doivent être regroupés en lots de sept. Si des lots plus petits sont constitués, un nombre d'échantillons moins important peut être testé avec le *therascreen EGFR RGQ PCR Kit*.
- Un échantillon doit être testé avec tous les mélanges réactionnels fournis dans le *therascreen EGFR RGQ PCR Kit*.
- Ne pas faire passer dans l'agitateur la *Taq* ni tout mélange contenant de la *Taq*, car cela peut désactiver cette enzyme.
- Pipetter la *Taq* en disposant soigneusement la pointe de la pipette juste sous la surface du liquide afin d'éviter qu'elle se recouvre d'une quantité excessive d'enzyme.

Actions à effectuer avant de commencer

- Vérifier que le Rotor-Gene Q *therascreen EGFR CE Assay Package* est installé avant la première utilisation de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (voir Annexe B : installation du *therascreen EGFR CE Assay Package*).

- Avant chaque utilisation, veiller à décongeler complètement tous les réactifs pendant une durée comprise entre 1 heure et 4,5 heures à température ambiante (15 à 25 °C), à les mélanger 10 fois en les retournant, puis à les centrifuger brièvement afin que le contenu soit rassemblé au fond des tubes.
- Mélanger tous les échantillons en les retournant 10 fois et les centrifuger brièvement afin que le contenu soit rassemblé au fond des tubes.
- Veiller à ce que la *Taq* soit à température ambiante (15 à 25 °C) avant chaque utilisation. Centrifuger brièvement le tube afin que toute l'enzyme soit rassemblée au fond du tube.

Procédure

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

Les durées de décongélation des réactifs, de préparation de la PCR et de stockage avant le début du cycle sont indiquées dans le tableau 5.

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

| Durée minimale de décongélation | Durée maximale de décongélation | 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 du cycle de PCR sur l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Remarque : amener la *Taq* (tube *Taq*) à température ambiante (15 à 25 °C) en même temps que les autres réactifs (voir la section « Stockage et manipulation des réactifs »). Centrifuger brièvement le tube afin que toute l'enzyme soit rassemblée 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 centrifuger brièvement afin que le contenu soit rassemblé au fond des tubes.

3. Préparer suffisamment de master mix de tests (mélange réactionnel de tests plus *Taq*) pour les échantillons d'ADN, une réaction avec le PC EGFR et une réaction avec le NTC conformément aux volumes indiqués dans le tableau 6. Inclure des réactifs pour un échantillon supplémentaire afin de disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR.

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

Tableau 6. Préparation des master mix de tests

| Test | Tube de mélange réactionnel | Volume de mélange réactionnel | Volume de <i>Taq</i> ADN polymérase (tube <i>Taq</i>) |
|------------|-----------------------------|-------------------------------|--|
| Contrôle | CTRL | 19,5 µl × (n + 1)* | 0,5 µl × (n + 1)* |
| T790M | T790M | 19,5 µl × (n + 1) | 0,5 µl × (n + 1) |
| Délétions | Del | 19,5 µl × (n + 1) | 0,5 µl × (n + 1) |
| L858R | L858R | 19,5 µl × (n + 1) | 0,5 µl × (n + 1) |
| L861Q | L861Q | 19,5 µl × (n + 1) | 0,5 µl × (n + 1) |
| G719X | G719X | 19,5 µl × (n + 1) | 0,5 µl × (n + 1) |
| S768I | S768I | 19,5 µl × (n + 1) | 0,5 µl × (n + 1) |
| Insertions | Ins | 19,5 µl × (n + 1) | 0,5 µl × (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), car il s'agit du nombre maximal d'échantillons pour un cycle.

4. Homogénéiser doucement les master mix de tests 10 fois par aspiration-refoulement avec la pipette. Placer le nombre approprié de tubes en barrettes dans le bloc de chargement conformément à la répartition indiquée dans le tableau 7. Ajouter immédiatement 20 µl du master mix de tests approprié dans chaque tube de PCR en barrette.

Les bouchons doivent rester dans le conteneur en plastique pendant le temps nécessaire.

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

| Test | Contrôles | | | | | | | | Position | |
|------------|-----------|-----|----|----|----|----|----|----|----------|-------------------------|
| | P C | NTC | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | Numéro d'échantillon |
| 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 | |

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

Prendre soin d'éviter toute erreur de chargement ou de pipetage pour s'assurer d'effectuer correctement l'addition de NTC, des échantillons et de PC EGFR dans les tubes correspondants.

Chaque tube doit contenir un volume réactionnel total de 25 µl (20 µl de master mix de tests préparé lors de l'étape 3 [tableau 6] plus 5 µl de NTC/échantillon/PC). Les nombres 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'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

8. Une fois tous les tubes de PCR fermés, vérifier visuellement les niveaux de remplissage des tubes d'échantillons pour garantir qu'un échantillon a été ajouté dans chacun d'entre eux.
9. Retourner tous les tubes de PCR quatre fois pour homogénéiser les échantillons et les mélanges réactionnels.
10. Placer les tubes de PCR en barrettes sur le rotor à 72 puits dans les positions appropriées, conformément à la répartition indiquée dans le tableau 7.

Chaque cycle de PCR peut comprendre un maximum de sept échantillons. Si le rotor n'est pas complètement rempli, mettre des tubes vides fermés dans toutes les positions vacantes.

11. Placer immédiatement le rotor à 72 puits dans l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Vérifier que la bague de verrouillage (un accessoire de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) est bien fixée au-dessus du rotor pour que les tubes ne bougent pas lors du cycle.

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

12. Double-cliquer sur l'icône « *therascreen* EGFR CE Locked Template » (Modèle verrouillé du *therascreen* EGFR CE) sur le bureau de l'ordinateur connecté à l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM pour lancer le logiciel Rotor-Gene Q (figure 10).



therascreen EGFR CE
Locked Template

Figure 10. Icône « EGFR CE Locked Template » (Modèle verrouillé du EGFR CE (détection des mutations d'EGFR)).

13. L'onglet « Setup » (Configuration) s'ouvre par défaut (figure 11). Veiller à ce que la bague de verrouillage soit correctement fixée et cocher la case Locking Ring Attached (Bague de verrouillage fixée). Fermer le capot de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

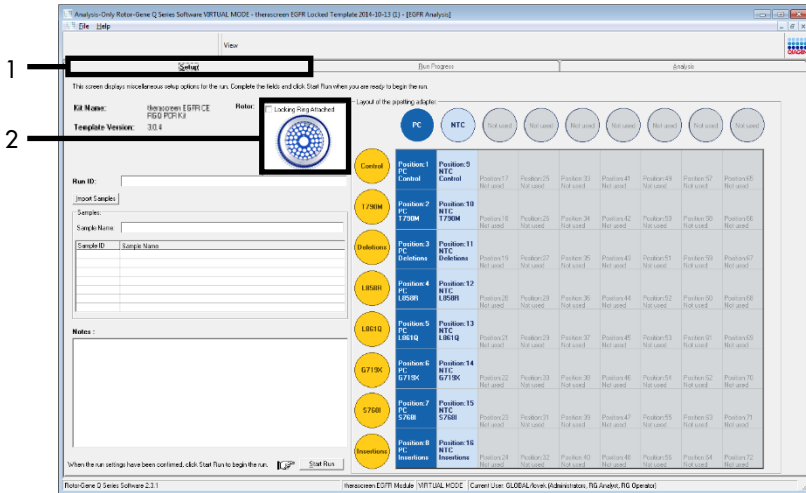


Figure 11. Onglet « Setup » (Configuration) (1) et case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage fixée) (2).

14. Saisir l'identifiant du cycle dans le champ Run ID (ID de cycle) conformément aux pratiques de votre laboratoire. Saisir le nom de l'échantillon dans le champ Sample Name (Nom d'échantillon) conformément aux pratiques de votre laboratoire et appuyer sur Return (Entrée).

Le nom de l'échantillon est alors ajouté à la liste d'échantillons en dessous et un « Sample ID » (ID d'échantillon) lui est attribué (1, 2, 3, etc.). En outre, le panneau « Layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipetage) sur la droite est réactualisé 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 d'échantillon Rotor-Gene Q) ou *.csv (valeurs séparées par des virgules) à l'aide du bouton Import Samples (Importer des échantillons). Avec cette méthode, les noms d'échantillons sont automatiquement renseignés.

Remarque : dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipetage), vérifier que l'ajout du nom de l'échantillon est mis en évidence par un changement de couleur et que le nom d'échantillon se trouve à la position de l'échantillon (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 8 caractères peuvent ne pas s'afficher entièrement dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipetage).

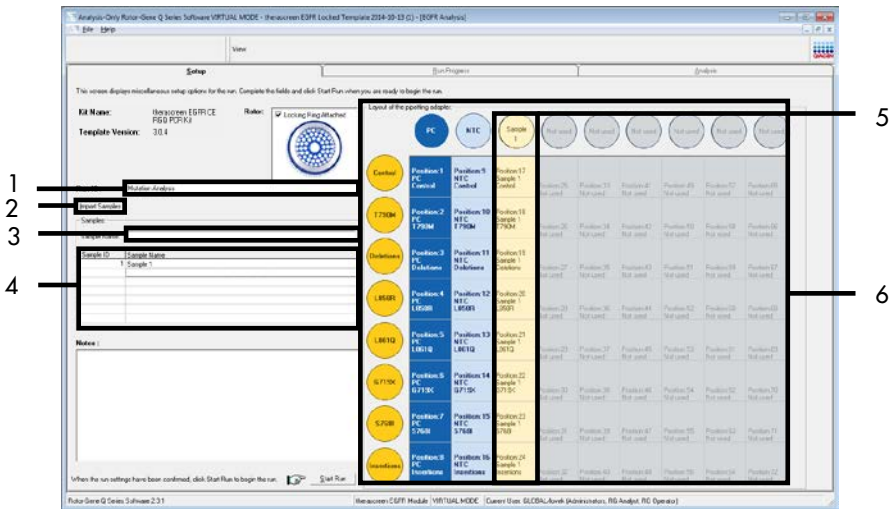


Figure 12. Saisie du « Run ID » (ID de cycle) et du « Sample Name » (Nom d'échantillon). 1 = champ « Run ID » (ID de cycle) ; 2 = bouton « Import Samples » (Importer des échantillons) ; 3 = champ « Sample Name » (Nom d'échantillon) ; 4 = Sample List (Liste des échantillons) ; 5 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipetage) ; 6 = cercle d'échantillon en surbrillance au-dessus d'une colonne de 8 tests.

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 d'échantillon) dans la liste des échantillons de sorte que l'échantillon sélectionné s'affiche dans le champ Sample Name (Nom d'échantillon) au-dessus. Modifier le nom de l'échantillon conformément aux pratiques de votre laboratoire et appuyer sur Return (Entrée) pour réactualiser le nom.

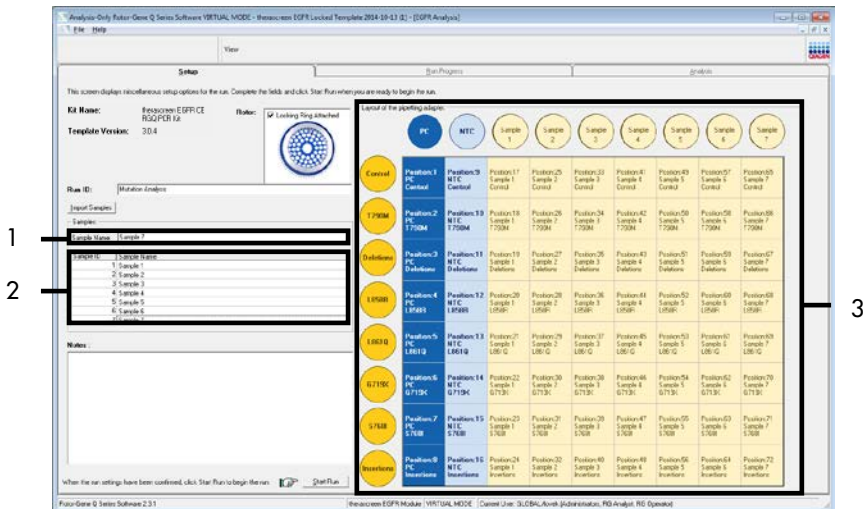


Figure 13. Saisie de nouveaux noms d'échantillons dans le champ « Sample Name » (Nom d'échantillon). 1 = champ « Sample Name » (Nom d'échantillon) ; 2 = Sample List (Liste des échantillons) ; 3 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipetage).

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 le cycle) (figure 14).

Remarque : si une position de rotor est inutilisée, un 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 fermés. Vérifier que toutes les positions inutilisées du rotor sont occupées par des tubes vides fermés et cliquer sur OK pour continuer.

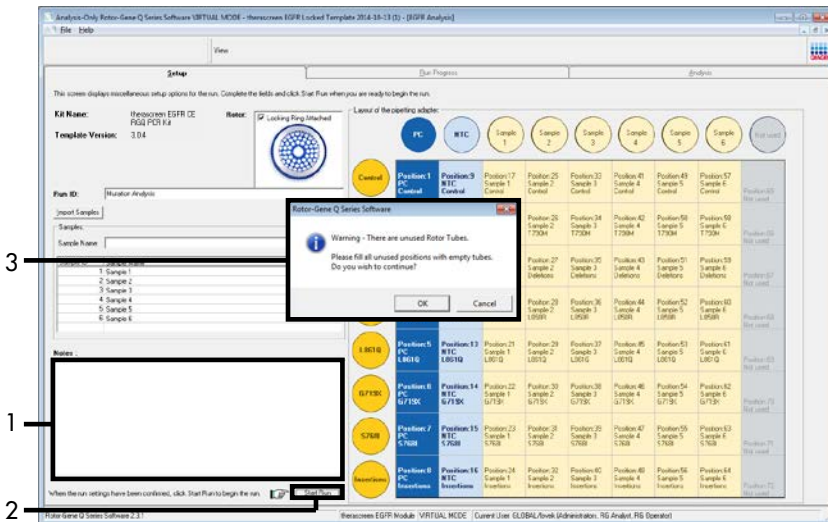


Figure 14. Champ « Notes » (1), bouton « Start Run » (Démarrer le cycle) (2) et Warning (Avertissement) concernant les positions de rotor inutilisées (3).

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

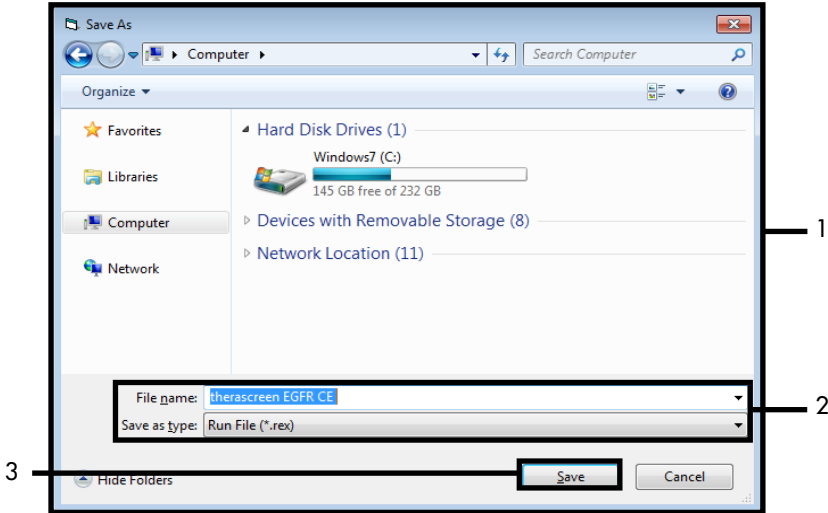


Figure 15. Fenêtre « Save As » (Enregistrer sous) (1). 2 = champs « File name » (Nom de fichier) et « Save as type » Type de fichier ; 3 = bouton « Save » (Enregistrer).

Le cycle de PCR démarre.

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

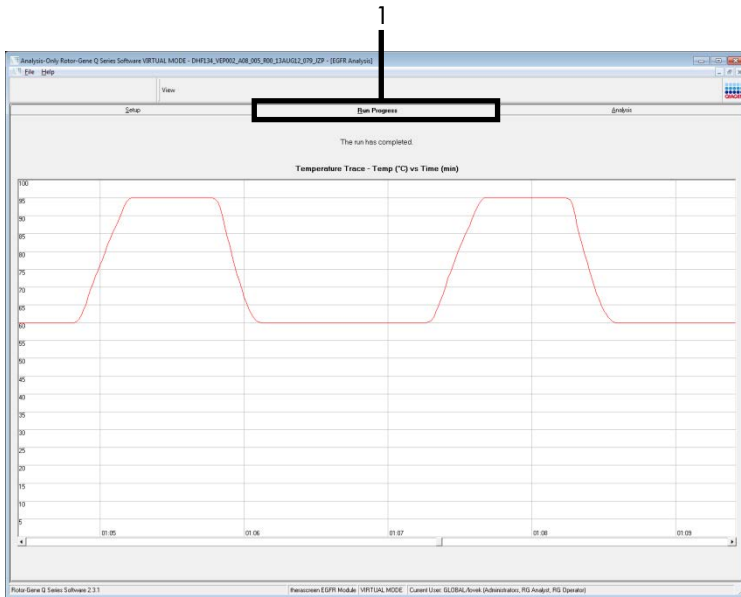


Figure 16. Onglet « Run Progress » (Progression du cycle).

À la fin du cycle, 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 dans la section « Interprétation des résultats (automatisée) ».

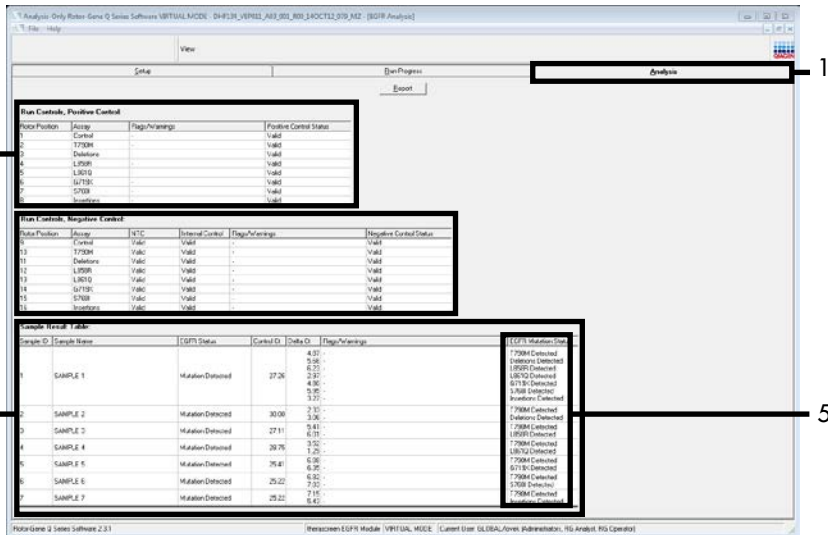


Figure 17. Onglet « Analysis » (Analyse) (1) et rapport des résultats. 2 = panneau « Run Controls, Positive Control » (Contrôles de cycles, contrôle positif) ; 3 = panneau « Run Controls, Negative Control » (Contrôles de cycles, contrôle négatif) ; 4 = « Sample Result Table » (Tableau des résultats d'échantillons) ; 5 = panneau « Mutation Status » (Statut mutationnel).

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

Run Controls, Positive Control (Contrôles de cycles, contrôle positif) : si les résultats se trouvent dans l'intervalle acceptable, la colonne « Positive Control Status » (Statut du contrôle positif) indique « Valid » (Valide). Dans le cas contraire, un résultat « Invalid » (Non valide) s'affiche.

Run Controls, Negative Control (Contrôles de cycles, contrôle négatif) : si les résultats du NTC et du contrôle interne se trouvent dans un intervalle acceptable, la colonne « Negative Control Status » (Statut du contrôle négatif) indique « Valid » (Valide). Dans le cas contraire, un résultat « Invalid » (Non valide) s'affiche.

Tableau des résultats d'échantillons : Les mutations spécifiques sont rapportées pour les échantillons positifs à une mutation dans la colonne « EGFR Mutation Status » (Statut mutationnel du gène EGFR).

19. Cliquer sur Report (Rapport) pour produire un fichier de rapport. La fenêtre « Report Browser » (Explorateur de rapports) s'ouvre. Sélectionner EGFR CE Analysis Report (Rapport d'analyse d'EGFR CE) sous Templates (Modèles), puis cliquer sur Show (Afficher) (figure 18).

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

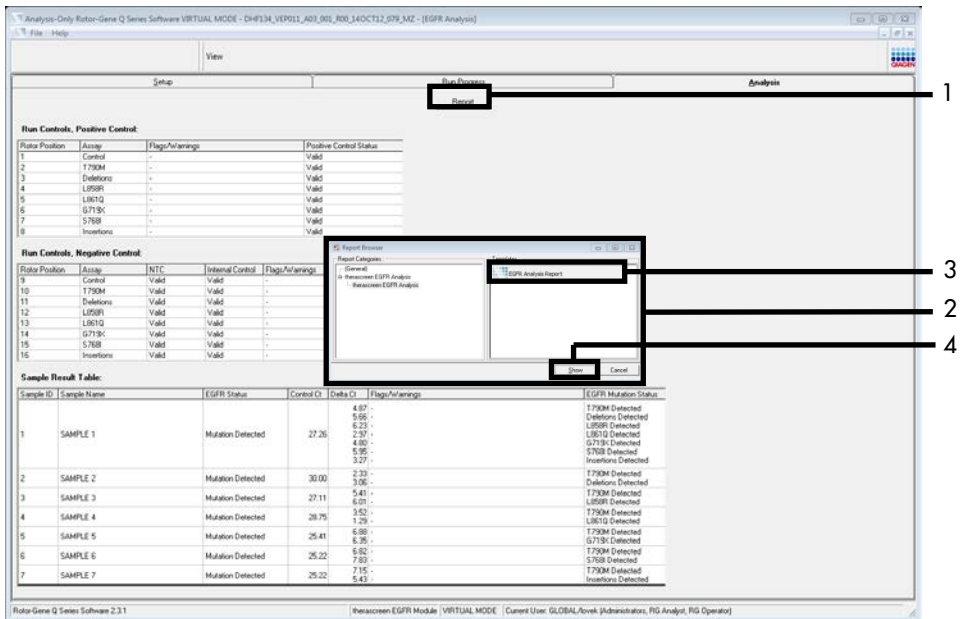


Figure 18. Sélection du modèle « EGFR CE Analysis Report » (Rapport d'analyse d'EGFR CE). 1 = « Report » (Rapport) ; 2 = panneau « Report Browser » (Explorateur de rapports) ; 3 = modèle « EGFR CE Analysis Report » (Rapport d'analyse d'EGFR CE) ; 4 = « Show » (Afficher).

Interprétation des résultats (automatisée)

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

Remarque : pour l'analyse manuelle des résultats, consulter la section Interprétation des résultats (manuelle).

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

Le logiciel Rotor-Gene Q effectue l'interpolation des signaux de fluorescence entre deux valeurs enregistrées. Les valeurs de C_T peuvent donc être tout nombre réel (entier ou non) compris dans un intervalle de 0 à 40. Pour le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, la valeur seuil est fixée à 0,075 unité de fluorescence relative sur le canal vert (FAM) et 0,02 sur le canal jaune (HEX). Ces valeurs sont configurées automatiquement dans le *therascreen* EGFR CE Assay Package. Les contrôles de cycles (PC, NTC et CI) sont évalués pour assurer que les valeurs de C_T sont acceptables et que les réactions s'effectuent correctement.

Les valeurs de ΔC_T des échantillons sont calculées pour chaque test de mutation selon l'équation suivante :

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

Les échantillons sont classés comme présentant une mutation positive si leur ΔC_T est inférieur ou égal à la valeur de ΔC_T seuil pour ce test. Au-dessus de cette valeur, l'échantillon peut soit contenir un pourcentage de mutations moindre par rapport à la capacité de détection du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (au-delà de la limite des tests), soit être négatif aux mutations et être rapporté comme « No Mutation Detected » (Pas de mutation détectée).

L'absence d'amplification dans les réactions de mutation est rapportée en tant que « No Mutation Detected » (Pas de mutation détectée). Les valeurs de ΔC_T calculées à partir de l'amplification du fond sont censées être supérieures aux valeurs de ΔC_T seuils et l'échantillon est classé comme « No Mutation Detected » (Pas de mutation détectée).

Les résultats des tests sont affichés sous la forme « Mutation Detected » (Mutation détectée), « No Mutation Detected » (Pas de mutation détectée), « Invalid » (Non valide) ou, si un contrôle de cycle échoue, « Run Control Failed » (Échec du contrôle de cycle). Pour les échantillons positifs aux mutations, les mutations spécifiques sont rapportées. Une tumeur peut contenir plusieurs mutations. Dans de tels cas, plusieurs mutations sont rapportées.

Indicateurs d'erreurs du Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package

Le tableau 8 (page suivante) liste les indicateurs d'erreurs pouvant être générés par le Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package, ainsi que leur signification et les actions à effectuer.

Les noms des indicateurs d'erreurs ont été établis pour fournir des informations sur le composant affecté du kit, l'échantillon ou le contrôle affecté et le mode d'échec.

Par exemple :

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = le test de contrôle (CTRL_ASSAY) du contrôle positif (Positive Control, PC) a échoué (FAIL)
- NTC_INT_CTRL_FAIL = le contrôle interne (INT_CTRL) du contrôle sans matrice (No Template Control, 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. Indicateurs d'erreurs, significations et actions à effectuer

| Indicateur d'erreur | Signification | Action |
|----------------------------|--|--|
| PC_CTRL_ASSAY_FAIL | Cycle de PCR non valide : C_T FAM hors intervalle pour le contrôle positif lors de la réaction de contrôle. | Répéter le cycle de PCR dans son intégralité. |
| PC_MUTATION_ASSAY_FAIL | Cycle de PCR non valide : C_T FAM hors intervalle pour au moins une réaction du contrôle des mutations. | Répéter le cycle de PCR dans son intégralité. |
| PC_CTRL_INVALID_DATA | Cycle de PCR non valide : impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle positif (mélange réactionnel de contrôle). | Répéter le cycle de PCR dans son intégralité. |
| PC_MUTATION_INVALID_DATA | Cycle de PCR non valide : impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle positif (mélange réactionnel de mutation). | Répéter le cycle de PCR dans son intégralité. |
| NTC_INT_CTRL_FAIL | Cycle de PCR non valide : contrôle interne au-delà de l'intervalle pour le contrôle négatif. | Répéter le cycle de PCR dans son intégralité. |
| NTC_INT_CTRL_EARLY_CT | Cycle de PCR non valide : contrôle interne en deçà de l'intervalle pour le contrôle négatif. | Répéter le cycle de PCR dans son intégralité. |
| NTC_INVALID_CT | Cycle de PCR non valide : FAM non valide (inférieur à la limite) pour le contrôle négatif. | Répéter le cycle de PCR dans son intégralité. |
| NTC_INVALID_DATA | Cycle de PCR non valide : impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle négatif. | Répéter le cycle de PCR dans son intégralité. |
| SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA | Échantillon non valide : impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle d'échantillons. | Configurer un nouveau cycle de PCR pour répéter le ou les échantillons concernés. |
| SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC | Échantillon non valide : C_T FAM trop faible dans le contrôle d'échantillon. | Diluer l'échantillon pour augmenter la valeur de C_T du contrôle. Cette dilution doit être calculée selon l'hypothèse qu'une dilution 1:1 avec l'eau fournie dans le kit augmente le C_T de 1,0. Une fois l'échantillon dilué, configurer un nouveau cycle d'évaluation des mutations pour répéter l'échantillon. Ou si l'échantillon a été dilué suite au cycle d'évaluation des échantillons d'ADN, procéder directement à un cycle de détection des mutations d'EGFR avec un échantillon dilué. |

Tableau 8. Indicateurs d'erreurs, significations et actions à effectuer (suite)

| Indicateur d'erreur | Signification | Action |
|--------------------------|---|--|
| SAMPLE_CTRL_FAIL | Échantillon non valide : C_T FAM trop élevé dans la réaction du contrôle d'échantillon. | Configurer un nouveau cycle de PCR pour répéter l'échantillon. Si l'échantillon demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR et que la quantité d'ADN est toujours insuffisante, extraire un échantillon à partir de deux coupes de tissu FFPE supplémentaires si suffisamment de tissu est disponible. Configurer un nouveau cycle de PCR pour tester cette extraction. Si l'échantillon est non valide, répéter le cycle de PCR sur la seconde extraction. Si le résultat n'est toujours pas valide après ce cycle, le statut mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué. |
| SAMPLE_INT_CTRL_FAIL | C_T trop élevé (ou pas de C_T) pour le contrôle interne (HEX), le canal FAM étant négatif aux mutations. | <p>Pour les échantillons auxquels est attribué un indicateur SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID avec une mutation détectée (ou non détectée) dans un mélange réactionnel de mutation cliniquement significatif, rapporter les résultats. Aucun test supplémentaire n'est requis.</p> <p>Diluer l'échantillon avec l'eau fournie dans le kit selon l'hypothèse qu'une dilution 1:1 augmente le C_T de la réaction de contrôle de 1,0, en veillant à ce que le volume final soit >40 μl (p. ex. 40 μl d'ADN et 40 μl d'eau du tube marqué DI).</p> <p>Configurer un nouveau cycle de PCR pour répéter l'échantillon. S'il demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR, extraire l'échantillon à partir de deux coupes FFPE supplémentaires. Configurer un nouveau cycle de PCR pour tester cette extraction.</p> <p>Si la seconde extraction est non valide, diluer comme décrit ci-dessus.</p> <p>Si le résultat n'est toujours pas valide après ce cycle, le statut mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué.</p> |
| SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT | Tube de mutation non valide : C_T HEX trop faible pour l'échantillon (contrôle interne) | <p>Pour les échantillons auxquels est attribué un indicateur SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID avec une mutation détectée (ou non détectée) dans un mélange réactionnel de mutation cliniquement significatif, rapporter les résultats. Aucun test supplémentaire n'est requis.</p> <p>Configurer un nouveau cycle de PCR pour répéter l'échantillon. Si celui-ci demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR, extraire un échantillon à partir de deux coupes de tissu FFPE supplémentaires si possible. Configurer un nouveau cycle de PCR pour tester cette extraction. Si le résultat est non valide, répéter le cycle de PCR sur la seconde extraction. Si le résultat n'est toujours pas valide après ce cycle, le statut mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué.</p> |

Tableau 8. Indicateurs d'erreurs, significations et actions à effectuer (suite)

| Indicateur d'erreur | Signification | Action |
|-----------------------------|---|--|
| SAMPLE_INVALID_DATA | Tube de mutation non valide : impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle interne. | <p>Pour les échantillons auxquels est attribué un indicateur SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID avec une mutation détectée (ou non détectée) dans un mélange réactionnel de mutation cliniquement significatif, rapporter les résultats. Aucun test supplémentaire n'est requis.</p> <p>Configurer un nouveau cycle de PCR pour répéter l'échantillon. Si celui-ci demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR, extraire un échantillon à partir de deux coupes de tissu FFPE supplémentaires si possible. Configurer un nouveau cycle de PCR pour tester cette extraction. Si le résultat est non valide, répéter le cycle de PCR sur la seconde extraction. Si le résultat n'est toujours pas valide après ce cycle, le statut mutationnel de l'échantillon est indéterminé et aucun test supplémentaire ne doit être effectué.</p> |
| SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID | L'échantillon est positif à au moins une mutation ; en même temps, le résultat du même échantillon est non valide pour au moins une mutation. | <p>Pour les échantillons auxquels est attribué un indicateur SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID avec une mutation détectée (ou non détectée) dans un mélange réactionnel de mutation cliniquement significatif, rapporter les résultats. Aucun test supplémentaire n'est requis.</p> <p>Pour les échantillons auxquels est attribué un indicateur SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID avec un résultat « INVALID » (NON VALIDE) obtenu dans un mélange réactionnel de mutation cliniquement significatif, retester l'échantillon avec tous les mélanges réactionnels en effectuant l'action de l'indicateur non valide spécifique.</p> <p>Si un indicateur SAMPLE_INT_CTRL_FAIL est généré en association avec un autre indicateur pour l'échantillon affecté, alors l'action de dilution de l'échantillon de l'indicateur SAMPLE_INT_CTRL_FAIL doit être effectuée. Configurer un nouveau cycle de PCR et retester l'échantillon.</p> <p>Pour les échantillons auxquels est attribué un indicateur SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID avec un résultat « INVALID » (NON VALIDE) obtenu dans un mélange réactionnel de mutation cliniquement significatif lors du nouveau cycle de PCR, extraire l'échantillon de deux coupes FFPE supplémentaires. Configurer un nouveau cycle de PCR avec tous les mélanges réactionnels pour tester cette extraction.</p> <p>Si cet échantillon produit de nouveau un résultat non valide pour un mélange réactionnel de mutation cliniquement significatif, retester l'échantillon avec tous les mélanges réactionnels en effectuant l'action de l'indicateur non valide spécifique. Si l'indicateur SAMPLE_INT_CTRL_FAIL est généré en association avec un autre indicateur pour l'échantillon affecté, alors l'action de dilution de l'échantillon de l'indicateur SAMPLE_INT_CTRL_FAIL doit être effectuée. Configurer un nouveau cycle de PCR et retester cet échantillon.</p> <p>Si l'indicateur SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID est affiché suite à la répétition du test, le statut mutationnel de l'échantillon est indéterminé.</p> |

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes éventuels. Pour de plus amples informations, consulter également la page de la foire aux questions (Frequently Asked Questions, FAQ) dans notre Centre d'assistance technique à l'adresse suivante : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des Services techniques QIAGEN seront ravis de répondre à toutes vos questions sur les informations et les protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et d'analyses (pour les coordonnées, voir la quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

Les échantillons NTC indiquent des résultats positifs sur le canal Green FAM

- | | |
|---|--|
| Une contamination s'est produite lors de la préparation de la PCR | Répéter la PCR avec de nouveaux réactifs en répliquats. Si possible, fermer les tubes de PCR juste après l'addition de l'échantillon à tester. Veiller à ce que le plan de travail et les appareils soient décontaminés à intervalles réguliers. |
|---|--|

Pas de signal avec le contrôle positif d'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'appareil Rotor-Gene Q MDx 5 plex HRM | Comparer le profil de température avec le protocole. S'il est incorrect, répéter le cycle. |
| c) Configuration incorrecte de la PCR | Vérifier les étapes de la procédure à l'aide du schéma de pipetage et recommencer 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 18) | Vérifier les conditions de stockage et la date d'expiration (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit si nécessaire. |
| e) Le <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit est périmé | Vérifier les conditions de stockage et la date d'expiration (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 de *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 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 approprié et ne doivent pas être utilisés seuls pour établir le diagnostic.

Ce produit est réservé au personnel ayant reçu les instructions et la formation appropriées pour les procédures de diagnostic *in vitro* et l'utilisation des appareils Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Ce produit est destiné à être utilisé uniquement sur un thermocycleur de *real-time* PCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Il est nécessaire de se conformer strictement au *manuel du theascreen EGFR RGQ PCR Kit* pour obtenir les meilleurs résultats possible. Il n'est pas recommandé de diluer les réactifs d'une manière autre que celle décrite dans ce manuel, car cela entraîne une baisse des performances.

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

Les amorces dans le mélange réactionnel pour délétions d'EGFR ont été conçues pour cibler plusieurs délétions dans l'exon 19, couvrant les nucléotides 55 174 772 à 55 174 795 (GRCh38 chr7), pour une portée de 23 pb.

Bien que le test de délétions dans l'exon 19 ait été validé analytiquement et que sa capacité à détecter 14 délétions spécifiées dans l'exon 19 ait été démontrée (voir la liste dans le tableau 1 de ce manuel), il est possible que d'autres mutations (y compris, mais sans s'y limiter, des délétions supplémentaires dans l'exon 19, des insertions dans l'exon 19 et la mutation L747P) soient amplifiées par le mélange réactionnel pour délétions.

Si elles sont présentes, de telles mutations supplémentaires entraînent un résultat « Deletions Detected » (Délétions détectées) pour un échantillon patient donné.

En outre, il est possible que la mutation L858Q soit détectée par le test de L858R. Par conséquent, si elle est présente dans un échantillon patient, la mutation L858Q peut entraîner un résultat « L858R Detected » (Mutation L858R détectée).

Prêter attention aux dates d'expiration et aux conditions de stockage imprimées sur l'emballage et les étiquettes des composants. Ne pas utiliser de composants périmés ou stockés dans de mauvaises conditions.

Caractéristiques de performances

Performances analytiques

Les caractéristiques de performances spécifiques du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ont été déterminées par des études utilisant des prélèvements de tissu FFPE effectués chez des patients avec CPNPC et des lignées cellulaires humaines 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 d'EGFR spécifiques souhaitées. Lorsque les prélèvements de tissu ou les lignées cellulaires n'étaient pas disponibles, de l'ADN plasmidique a été utilisé.

Limite du blanc (Limit of Blank, LoB), intervalle de validité et valeurs seuils

Au total, 417 échantillons FFPE ont été testés dans une étude conforme au document EP17-A du CLSI (2004) (12) afin de déterminer la limite du blanc (Limit of Blank, LOB) et les valeurs seuils pour chaque test de mutation. En outre, l'intervalle de validité a été déterminé. Les valeurs seuils ont été établies et sont indiquées dans le tableau 9.

Tableau 9. Valeurs seuils établies pour chaque test de mutation

| Test | Seuil (ΔCT) |
|------------|-----------------------|
| 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 de C_T de la réaction du contrôle a été établi comme allant de 23,70 à 31,10.

Les valeurs seuils et les intervalles de validité du test ont été vérifiés à l'aide d'étalons et d'autres échantillons FFPE. Lors de la vérification, la capacité des valeurs seuils à distinguer la bonne mutation dans le fond d'ADN de type sauvage a été évaluée en examinant chaque test avec l'introduction d'une concentration élevée d'ADN génomique et d'une concentration élevée d'ADN de mutation (voir la section « Réactivité croisée »). L'effet de la quantité d'ADN introduit sur la détection des mutations a aussi été évalué (voir Effet de la quantité d'ADN introduit sur les valeurs de ΔC_T).

Pour évaluer les performances du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit en l'absence de matrice et garantir qu'un blanc ou un échantillon d'ADN de type sauvage ne génère pas de signal pouvant indiquer une faible concentration de mutation, des échantillons sans matrice et de l'ADN d'EGFR de type sauvage de tissu de CPNC ont été évalués. Il n'y a eu aucun résultat positif aux mutations pour les échantillons NTC et pour les échantillons FFPE de type sauvage.

Effet de la quantité d'ADN introduit sur les valeurs de ΔC_T

La quantité d'ADN introduit est définie comme la quantité totale d'ADN d'EGFR amplifiable dans un échantillon, telle que déterminée par les valeurs de C_T de la réaction de contrôle. Pour démontrer que les performances du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit sont constantes sur tout l'intervalle de valeurs de C_T de la réaction de contrôle (23,70–31,10), les 7 tests de mutations d'EGFR ont été évalués par rapport à une série de dilution 1:3 à six points (ADN extrait de lignées cellulaires FFPE). La valeur de C_T cible pour la dilution 1 était d'environ 24,70 pour chaque mutation. La dilution finale, qui a donné une valeur de C_T d'environ 32 à 33, était en dehors de l'intervalle de valeurs de C_T de la réaction de contrôle. Les valeurs de ΔC_T mesurées pour différentes quantités totales d'ADN introduit étaient généralement cohérentes sur l'intervalle de validité du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Réactivité croisée

L'introduction d'une quantité élevée d'ADN d'EGFR de type sauvage a été testée pour évaluer l'amplification non spécifique. Les résultats ont démontré que les valeurs de ΔC_T les plus faibles dépassaient les seuils établis, indiquant qu'aucune amplification non spécifique n'a eu lieu.

Les lignées cellulaires FFPE avec une forte quantité d'ADN introduit 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 dû à la réactivité croisée entre les réactions des mutants. Les valeurs de ΔC_T minimales étaient toutes supérieures aux valeurs seuils des tests respectifs pour tous les échantillons d'ADN et mélanges réactionnels non correspondants.

Exactitude : comparaison avec la méthode d'analyse de référence

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

Les échantillons présentant des résultats valides à la fois avec le séquençage Sanger et le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ont été analysés pour évaluer la concordance positive en pourcentage (CPP), la concordance négative en pourcentage (CNP) et la concordance globale en pourcentage (CGP). Ces pourcentages, ainsi que les intervalles de confiance (IC) à 95 % bilatéraux correspondants, sont résumés dans le tableau 10.

Tableau 10. Analyse de la concordance

| Mesure | Concordance en pourcentage (N) | IC 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 (c.-à-d. pas de mutation détectée) avec le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, mais présentait un résultat « mutation détectée » avec le séquençage Sanger.
- 27 (96,4 %) échantillons présentaient un résultat « mutation détectée » avec le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, mais présentaient des résultats « type sauvage » avec le séquençage Sanger.

Valeurs de la limite de détection (Limit of Detection, LoD)

Une étude a été réalisée pour déterminer la LoD de chacune des 29 mutations d'EGFR. La LoD a été définie comme la plus faible quantité d'ADN mutant sur un fond d'ADN de type sauvage pour laquelle un échantillon mutant donne des résultats positifs aux mutations dans 95 % des résultats de tests (C_{95}).

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

Tableau 11. LoD établies à l'aide de prélèvements cliniques FFPE avec des quantités faibles et élevées d'ADN introduit, de lignées cellulaires FFPE ou de plasmides

| Exon | Mutation | COSMIC* ID | Changement de base | LoD (% mutant) | |
|-------|-------------|-------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| | | | | Faible | Élevée |
| 18 | G719A | 6239 | 2156G>C | 7,41 [†] | 1,57 [†] |
| | G719S | 6252 | 2155G>A | 5,08 [†] | 7,75 [§] |
| | G719C | 6253 | 2155G>T | 10,30 [†] | – [†] |
| 19 | Délétions | 12384 | 2237_2255>T | 1,58 [§] | 0,49 [§] |
| | | 12387 | 2239_2258>CA | 4,91 [†] | 1,48 [†] |
| | | 12419 | 2238_2252>GCA | 16,87 [†] | 12,47 [†] |
| | | 12422 | 2238_2248>GC | 3,24 [†] | 1,65 [†] |
| | | 13551 | 2235_2252>AAT | 4,24 [†] | 1,41 [†] |
| | | 12678 | 2237_2251del15 | 0,55 [§] | 0,24 [§] |
| | | 6218 | 2239_2247del9 | 8,47 [†] | – [†] |
| | | 12728 | 2236_2253del18 | 2,43 [†] | – [†] |
| | | 12367 | 2237_2254del18 | 2,72 [†] | – [†] |
| | | 6210 | 2240_2251del12 | 4,09 [†] | – [†] |
| | | 6220 | 2238_2255del18 | 2,70 [†] | 0,82 [†] |
| | | 6223 | 2235_2249del15 | 6,40 [†] | 1,63 [†] |
| | | 6225 | 2236_2250del15 | 2,80 [†] | 1,42 [†] |
| | | 6254 | 2239_2253del15 | 0,86 [§] | 0,47 [§] |
| | | 6255 | 2239_2256del18 | 0,14 [§] | 0,05 [§] |
| | | 12369 | 2240_2254del15 | 4,94 [§] | 1,56 [§] |
| | | 12370 | 2240_2257del18 | 8,10 [§] | 2,08 [§] |
| | | 12382 | 2239_2248TTAAGAGAAG>C | 0,25 [§] | 0,10 [§] |
| 12383 | 2239_2251>C | 4,58 [§] | 1,74 [§] | | |

Tableau 11. LoD établies à l'aide de prélèvements cliniques FFPE avec des quantités faibles et élevées d'ADN introduit, de lignées cellulaires FFPE ou de plasmides (suite de la page précédente)

| Exon | Mutation | COSMIC* ID | Changement de base | LoD (% mutant) | |
|------|------------|------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| | | | | Faible | Élevée |
| 20 | S768I | 6241 | 2303G>T | 7,66 [†] | 2,18 [†] |
| | Insertions | 12376 | 2307_2308insGCCAGCGTG | 11,61 [†] | – [‡] |
| | | 12378 | 2310_2311insGGT | 4,91 [†] | 1,31 [†] |
| | | 12377 | 2319_2320insCAC | 2,40 [†] | 0,65 [†] |
| | T790M | 6240 | 2369C>T | 9,72 [†] | 5,09 [†] |
| 21 | L858R | 6224 | 2573T>G | 5,94 [†] | 1,13 [†] |
| | L861Q | 6213 | 2582T>A | 2,22 [†] | 0,66 [†] |

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

[†] Les valeurs de LoD ont été établies à l'aide de lignées cellulaires.

[‡] Les valeurs de LoD ont été établies à l'aide de plasmides.

[§] Les valeurs de LoD ont été établies à l'aide d'échantillons cliniques.

[¶] Non évaluée

Interférence

Effets des tissus nécrotiques

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

Substances exogènes

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

Reproductibilité

Reproductibilité d'un lot à l'autre

La procédure des tests du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit fait appel à deux kits distincts : le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit ou le QIAamp DNA FFPE Tissue Kit pour l'isolement de l'ADN, ainsi que le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit pour l'amplification de l'ADN et la détection du statut mutationnel du gène EGFR. La reproductibilité d'un lot à l'autre et l'interchangeabilité des lots ont été démontrées à l'aide de 3 lots du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit et de 3 lots du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Le pourcentage moyen de détections correctes pour les lots du test de mutation d'EGFR était de 97,8 % (317/324) et celui des échantillons de type sauvage était de 100 % (379/379).

Manipulation des prélèvements

La reproductibilité du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit a été évaluée à l'aide de coupes effectuées sur trois blocs de prélèvements FFPE, à savoir un bloc avec une délétion dans l'exon 19 (2235-2249 del15), un bloc avec la mutation L858R dans l'exon 21 et un bloc de type sauvage. Pour chaque prélèvement, des extractions ont été effectuées en double sur 3 sites et testées lors de 3 jours non consécutifs sur une période de 6 jours, produisant un total de 18 points de données par prélèvement. Sur chaque site, 2 opérateurs ont effectué les tests en utilisant 1 lot du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (1 lot par site, 3 lots au total) avec le même lot de réactifs du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit sur tous les sites. Tous les résultats de prélèvements mutants et de type sauvage étaient valides et correspondaient au résultat de détection attendu (détection correcte = 100 %, 18/18 pour chaque prélèvement), confirmant la reproductibilité et la répétabilité du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit pour l'étape préanalytique d'isolement de l'ADN.

Précision et reproductibilité

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

Un design d'étude matriciel a été mis en œuvre pour évaluer la reproductibilité du test en faisant effectuer les tests des échantillons dans 3 laboratoires (sites) avec 3 lots de *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (3 lots sur 3 sites) par 2 opérateurs sur chaque site sur 2 appareils par site, chaque échantillon (préparé à une concentration proche de la LoD) étant testé en réplicat pendant un total de 16 jours. La reproductibilité a été testée pour chaque mutation individuelle pendant des 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 d'EGFR testées

| Exon | Mutation | COSMIC * ID | Détections | | % correctes IC à 95 % unilatéral minimal | |
|--------------|-----------------------|------------------------|-----------------|-------------|--|-------|
| | | | Correctes/total | % correctes | | |
| 18 | G719A | 6239 | 77/78 | 98,72 | 94,06 | |
| 19 | Délétion ^s | 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 | |
| | | Insertion ^s | 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 des composantes de la variance a été effectuée pour estimer l'écart-type et les intervalles de confiance à 95 % pour la variabilité intra-cycle, intercycle, interjour, interlot et intersite. Pour toutes les composantes de la variance, le coefficient de variation total (CV) était $\leq 14,11$ % pour toutes les mutations d'EGFR testées. Parmi tous les membres du panel de mutants, le CV était $\leq 8,33$ % pour la variabilité interlot, interjour et interanalyse. Le CV pour la variabilité intra-cycle (répétabilité/précision) était compris entre 5,99 % et 13,49 %.

Performances cliniques

Données des résultats cliniques : GIOTRIF®

L'essai clinique LUX-Lung 3 était un essai clinique de phase 3 ouvert international multicentrique randomisé comparant l'afatinib à la chimiothérapie en traitement de première intention, chez des patients avec adénocarcinome du poumon de stade IIIB ou IV présentant une mutation activatrice d'EGFR (ClinicalTrials.gov, numéro NCT00949650). L'éligibilité des patients à l'essai clinique a été déterminée en évaluant le statut mutationnel d'EGFR des patients à l'aide du test clinique (Clinical Trial Assay, CTA). Des tests rétrospectifs de prélèvements de tissus ont été effectués avec le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Une étude de transition a été réalisée afin d'évaluer la concordance entre le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit et le CTA.

À partir des résultats du CTA, 345 patients ont été inclus dans l'ensemble randomisé (afatinib : 230 patients ; chimiothérapie : 115 patients). Le critère d'efficacité principal 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 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Une amélioration statistiquement significative de la SSP telle que déterminée par le CEI a été démontrée chez les patients randomisés pour l'afatinib par rapport à ceux randomisés pour la chimiothérapie, chez la population générale positive au CTA et la population positive au *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit/au CTA. Les résultats d'efficacité globale sont résumés dans le tableau 13 et la figure 19.

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

| Paramètre | Population positive au <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit/au CTA (n = 264) | | Population CTA+, n = 345 | |
|---|---|---------------------|---------------------------|---------------------|
| | Chimiothérapie n = 86 | Afatinib n = 178 | Chimiothérapie n = 115 | Afatinib n = 230 |
| Survie sans progression (SSP) | | | | |
| Nombre de décès ou de progressions, N (%) | 53 (61,6 %) | 120 (67,4 %) | 69 (60,0 %) | 152 (66,1 %) |
| Médiane de SSP (mois) | 6,9 | 11,2 | 6,9 | 11,1 |
| IC à 95 % de la médiane de SSP | 5,3–8,2 | 9,7–13,7 | 5,4–8,2 | 9,6–13,6 |
| Rapport de risque | 0,49 | | 0,58 | |
| IC à 95 % du rapport de risque | 0,35–0,69 | | 0,43–0,78 | |
| Valeur p (test de log-rank stratifié)* | <0,0001 | | <0,001 | |

* Stratifié par statut mutationnel d'EGFR et par race.

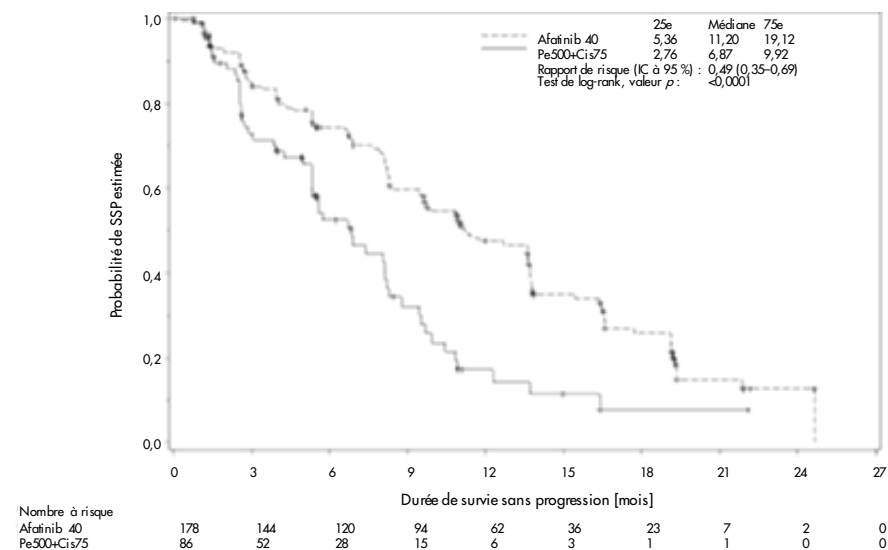


Figure 19. Courbe de survie sans progression (SSP) de Kaplan-Meier par groupe de traitement d'après un examen indépendant (population positive au *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit/au CTA).

L'analyse du sous-ensemble positif au *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit et au CTA (n = 264) a révélé que les patients traités avec l'afatinib présentaient une augmentation significative de la durée de SSP (médiane de SSP de 11,2 contre 6,9 mois) et étaient moins susceptibles de présenter une maladie progressive ou de décéder (RR = 0,49, IC à 95 % [0,35–0,69], $p < 0,0001$) que les patients sous chimiothérapie. Le bénéfice clinique observé dans le sous-ensemble de patients testés avec le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit était comparable à celui observé chez l'ensemble de la population de l'étude (n = 345).

Données des résultats cliniques : IRESSA®

L'essai clinique de mesure de suivi de IRESSA (IRESSA Follow-up Measure, IFUM) était une étude de phase 4 ouverte à un seul bras (NCT01203917) ayant pour objectif de caractériser l'efficacité et la tolérance du géfitinib en première intention, chez des patients caucasiens avec CPNPC métastatique ou localement avancé de phase IIIA/B/IV positif à une mutation d'EGFR. L'étude IFUM a été conçue pour évaluer le taux de réponse objective selon les critères RECIST chez des patients caucasiens avec CPNPC présentant une mutation d'EGFR sélectionnés de manière prospective.

Les prélèvements tumoraux des patients éligibles ont été évalués de manière prospective à l'aide du CTA. Ils devaient présenter une délétion dans l'exon 19 de l'EGFR ou une mutation par substitution, à savoir L858R, L861Q ou G719X, et ne devaient pas présenter de mutation T790M ou S768I ni d'insertions dans l'exon 20. Des tests rétrospectifs de prélèvements provenant de patients dépistés pour l'essai clinique IFUM ont été effectués à l'aide du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit de diagnostic compagnon. Une étude de transition a été réalisée afin d'évaluer la concordance du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit avec le CTA utilisé pour sélectionner les patients pour l'essai clinique IFUM. La concordance globale 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 à 95 % : 96,9 %–99,0 %) avec une CPP de 88,2 % (n = 90/102 ; IC à 95 % : 80,4 %–93,8 %) et une CNP de 99,8 % (n = 610/611 ; IC à 95 % : 99,1 %–100,0 %).

Les résultats du CTA ont été obtenus pour 859 patients dépistés. Parmi eux, 106 patients étaient admissibles au traitement par géfitinib. Sur 859 échantillons avec un résultat au CTA, 765 échantillons étaient disponibles pour des tests rétrospectifs à l'aide du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, y compris 87 échantillons qui se sont révélés positifs à une mutation d'EGFR avec le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit et le CTA.

Le critère d'efficacité principal 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 investigateurs. Le bénéfice clinique observé dans le sous-ensemble de patients testés avec le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit était comparable à celui observé chez l'ensemble de la population de l'étude.

L'ensemble des résultats d'efficacité est résumé dans le tableau 14.

Tableau 14. Bénéfice clinique des patients testés avec le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 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 |
|--|--|-----------------------------|
| Taux de réponse objective (TRO) par le BICR | | |
| Nombre de réponses (N) | 42 | 53 |
| TRO, % (IC 95 %) | 48,3 (38,1–58,6) | 50,0 (40,6–59,4) |
| Durée médiane de réponse (mois) | 6,9 (5,6–11,4) | 6,0 (5,6–11,1) |
| Taux de réponse objective (TRO) par les investigateurs | | |
| Nombre de réponses (N) | 62 | 74 |
| TRO, % (IC 95 %) | 71,3 (61,0–79,7) | 69,8 (60,5–77,7) |
| Durée médiane de réponse (mois) | 8,3 (7,2–11,3) | 8,3 (7,6–11,3) |

BICR : Blinded independent central review (comité d'examen central indépendant en aveugle) ; IC : intervalle de confiance ; CTA : Clinical Trial Assay (test clinique).

Remarque : Kit+ indique les résultats positifs aux délétions dans l'exon 19 et à L8585R/L861Q/G719X.

Étant donné que le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit n'a pas été utilisé pour sélectionner les patients pour l'essai clinique IFUM, des analyses d'efficacité supplémentaires ont été conduites pour prendre en compte les patients qui n'avaient pas été inclus dans l'essai, car ils avaient été testés négatifs avec le CTA, mais auraient pu être testés positifs avec le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (c.-à-d. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA-), ainsi que les patients qui avaient été inclus dans l'essai, mais dont les résultats n'étaient pas valides lors du nouveau test avec le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (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 June 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 |
|--|--|
|  | Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions |
|  | À utiliser avant |
|  | Dispositif médical de diagnostic in vitro |
|  | Référence catalogue |
|  | Numéro de lot |
|  | Référence produit |
|  | Conserver à l'abri de la lumière |
|  | Code article international (Global Trade Item Number, GTIN) |
| Rn | R désigne une révision du mode d'emploi (manuel) et n représente le numéro de révision |
|  | Limite de température |
|  | Fabricant |
|  | Consulter le mode d'emploi |
|  | Attention |

Annexe A : protocole manuel du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

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

Informations générales

- Pour la liste du matériel nécessaire, consulter la section « Matériel nécessaire mais non fourni ».
- Pour des instructions détaillées sur la préparation et la répartition des échantillons, voir les sections « Protocole : évaluation des échantillons » et « Protocole : détection des mutations d'EGFR ».
- Veiller à ce que les paramètres des cycles soient corrects avant le début de chaque cycle.

Protocole : création d'un profil de température

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

Procédure

Les paramètres des cycles sont indiqués dans le tableau 15.

Tableau 15. Profil de température

| Cycles | Température | Durée | Acquisition des données |
|--------|-------------|-------------|-------------------------|
| 1 | 95 °C | 15 minutes | Aucune |
| 40 | 95 °C | 30 secondes | Aucune |
| | 60 °C | 60 secondes | Green et Yellow |

1. Double-cliquer sur l'icône du logiciel Rotor-Gene Q 2.3 sur le bureau de l'ordinateur connecté à l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
2. Pour créer un nouveau modèle, sélectionner Empty Run (Cycle vierge), puis cliquer sur New (Nouveau) pour ouvrir le « New Run Wizard » (Assistant nouveau cycle).
3. Sélectionner 72-Well Rotor (Rotor à 72 puits) comme type de rotor. Confirmer la bonne fixation de la bague de verrouillage en cochant la case Locking Ring Attached (Bague de verrouillage fixée). Cliquer sur Next (Suivant) (figure 20).

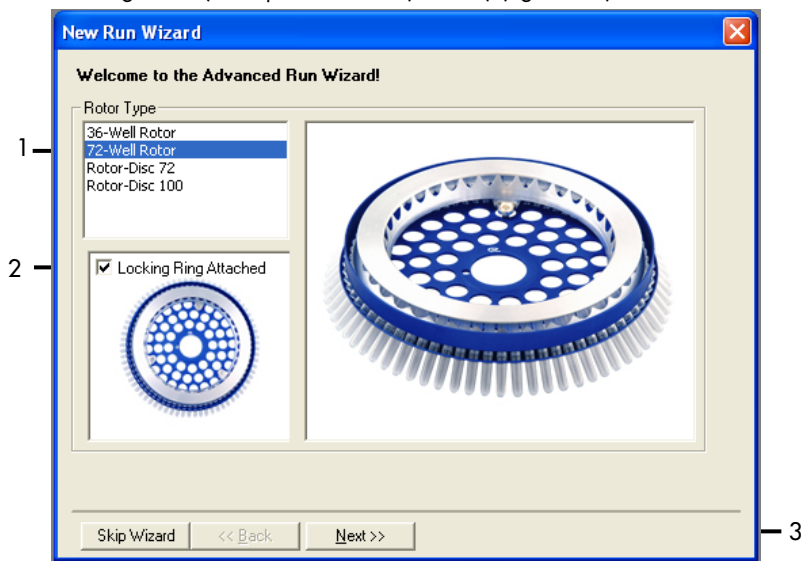


Figure 20. Boîte de dialogue « New Run Wizard » (Assistant nouveau cycle). 1 = « Rotor type » (Type de rotor) ; 2 = case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage fixée) ; 3 = « Next » (Suivant).

4. Saisir le nom de l'opérateur. Ajouter toutes remarques éventuelles et saisir 25 comme valeur de volume réactionnel. Veiller à ce que 1, 2, 3... soit spécifié dans le champ Sample Layout (Répartition des échantillons). 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.

1

2

3

Figure 21. Saisie du nom de l'opérateur et des volumes réactionnels. 1 = champs « Operator » (Opérateur) et « Notes » ; 2 = champs « Reaction Volume » (Volume réactionnel) et « Sample Layout » (Répartition des échantillons) ; 3 = « Next » (Suivant).

5. Cliquer sur « Edit Profile » (Modifier le profil) dans la boîte de dialogue « New Run Wizard » (Assistant nouveau cycle) (figure 22), puis vérifier les paramètres des cycles comme indiqué dans les étapes suivantes.

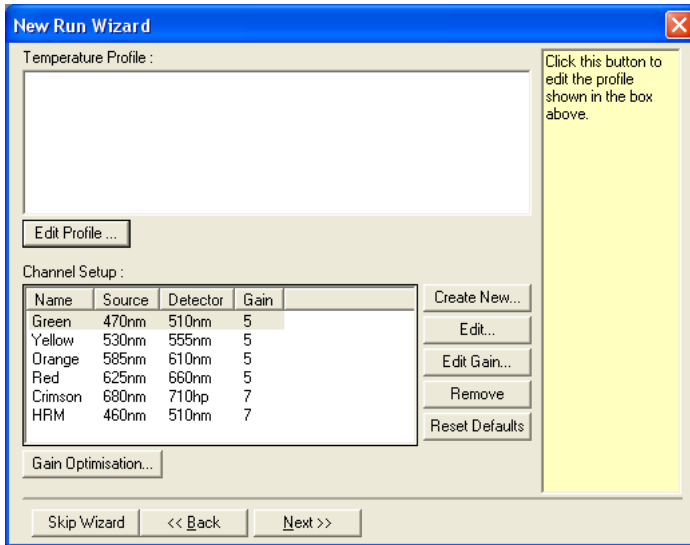


Figure 22. « Edit Profile » (Modifier le profil) dans la fenêtre « New Run Wizard » (Assistant nouveau cycle).

6. Cliquer sur « Insert after » (Insérer après) puis sélectionner « New Hold at Temperature » (Nouveau palier de température) (figure 23).

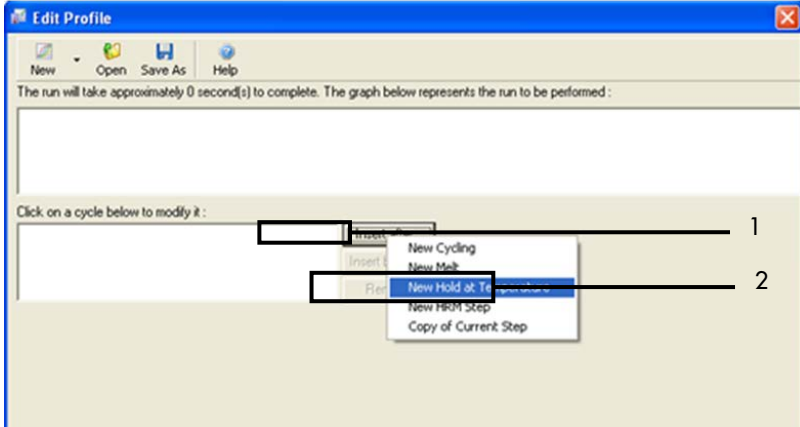


Figure 23. Insertion d'une étape d'incubation initiale. 1 = « Insert after » (Insérer après) ; 2 = « New Hold at Temperature » (Nouveau palier de température du palier).

7. Attribuer au champ Hold Temperature (Température du palier) une valeur de 95°C et au champ Hold Time (Durée du palier) une valeur de 15 mins 0 secs (15 min et 0 s). Cliquer sur « Insert After » (Insérer après) puis sélectionner « New Cycling » (Nouveau cycle) (figure 24).

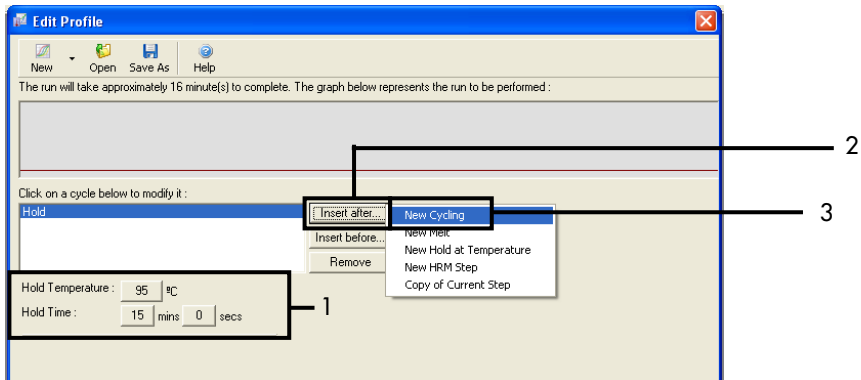


Figure 24. Étape d'incubation initiale à 95 °C. 1 = « Hold Temperature » (Température du palier) et « Hold Time » (Durée du palier) ; 2 = « Insert after » (Insérer après) ; 3 = « New Cycling » (Nouveau cycle).

8. Attribuer au nombre de répétitions de cycles une valeur de 40. Sélectionner la première étape et la définir sur 95 °C pendant 30 secondes (figure 25).

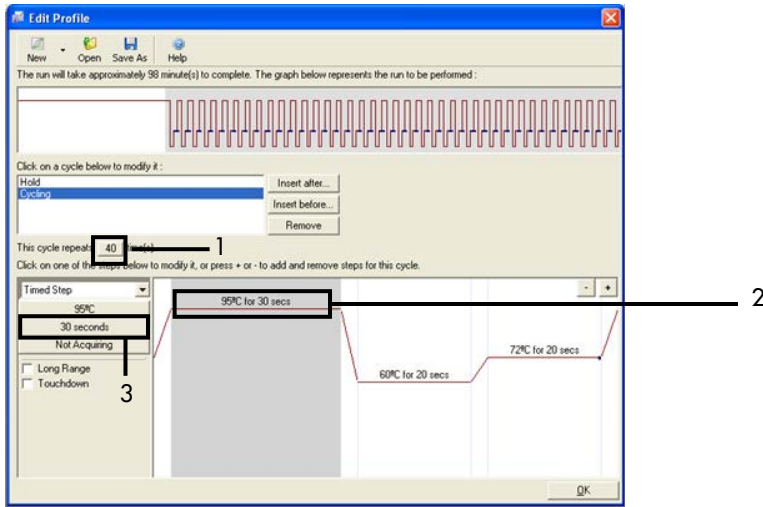


Figure 25. Étape du cycle à 95 °C. 1 = case « Cycle repeats » (Nombre de répétitions du cycle) ; 2 = réglage de la température pour l'étape 1 ; 3 = réglage de la durée pour l'étape 1.

9. Mettre la deuxième étape en surbrillance et la définir sur 60 °C pendant 60 secondes. Cliquer sur Not Acquiring (Pas d'acquisition) pour activer l'acquisition des données pendant cette étape (figure 26).

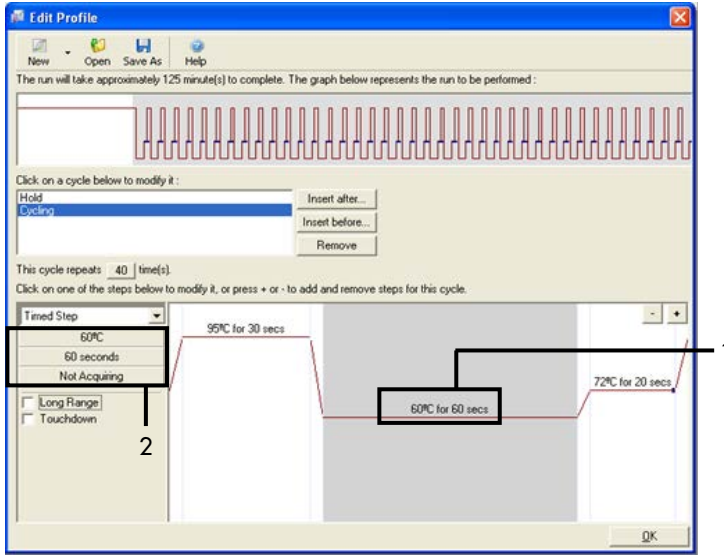


Figure 26. Étape de cycle à 60°C. 1 = réglage de la température et de la durée pour l'étape 2 ; 2 = bouton « Not Acquiring » (Pas d'acquisition).

10. Sélectionner Green et Yellow comme canaux d'acquisition. Cliquer sur > afin de transférer ces canaux de la liste « Available Channels » (Canaux disponibles) vers la section Acquiring Channels (Canaux d'acquisition). Cliquer sur OK (figure 27).

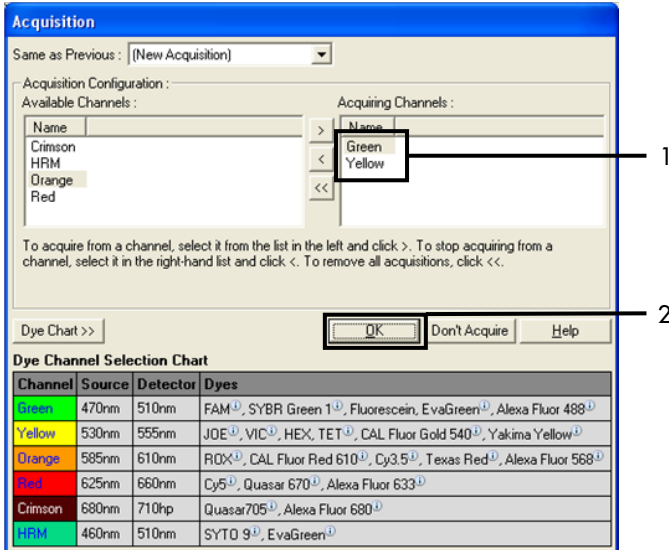


Figure 27. Acquisition à l'étape de cycle à 60 °C. 1 = canaux sélectionnés, 2 = bouton « OK ».

11. Mettre la troisième étape en surbrillance et cliquer sur le bouton - pour la supprimer.
Cliquez sur OK (figure 28).

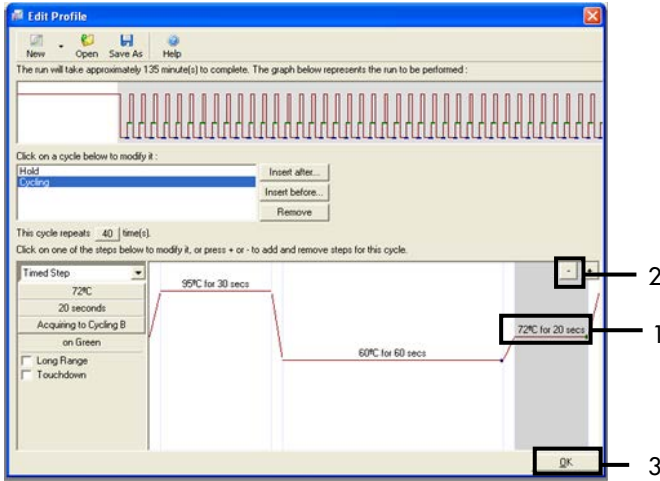


Figure 28. Suppression de l'étape d'élongation. 1 = troisième étape ; 2 = bouton de suppression ; 3 = bouton « OK ».

12. Dans la boîte de dialogue suivante, cliquer sur Gain Optimisation (Optimisation du gain) (figure 29).

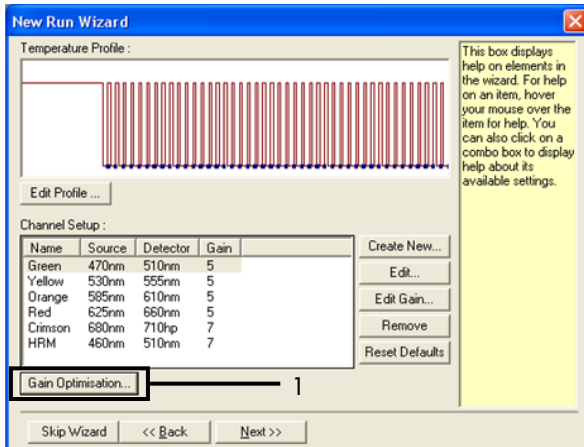


Figure 29. Optimisation du gain (1).

13. Cliquer sur Optimise Acquiring (Optimiser l'acquisition). Les paramètres de chaque canal sont affichés. Cliquer sur OK pour accepter ces valeurs par défaut pour les deux canaux. (figure 30).

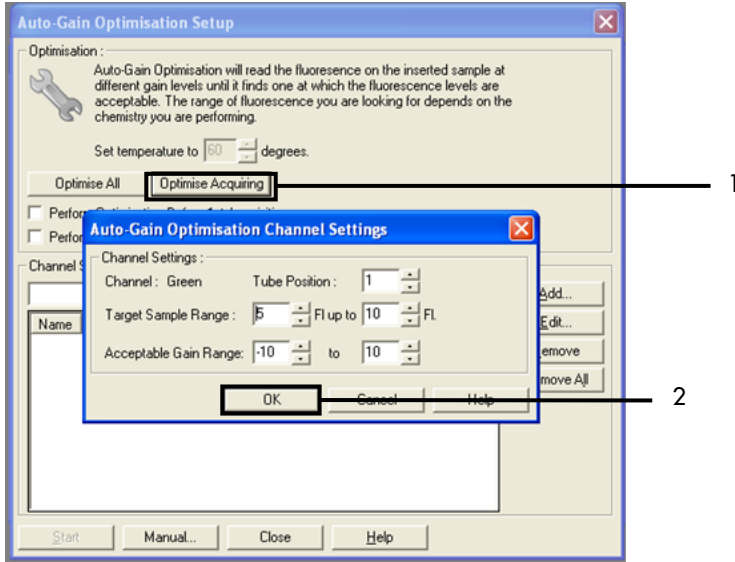


Figure 30. Optimisation du gain automatique pour le canal Green. 1 = « Optimise Acquiring » (Optimiser l'acquisition) ; 2 = bouton « OK ».

14. Cocher la case Perform Optimisation before 1st Acquisition (Effectuer l'optimisation avant la 1^{re} acquisition), puis cliquer sur Close (Fermer) pour revenir à l'assistant (figure 31).

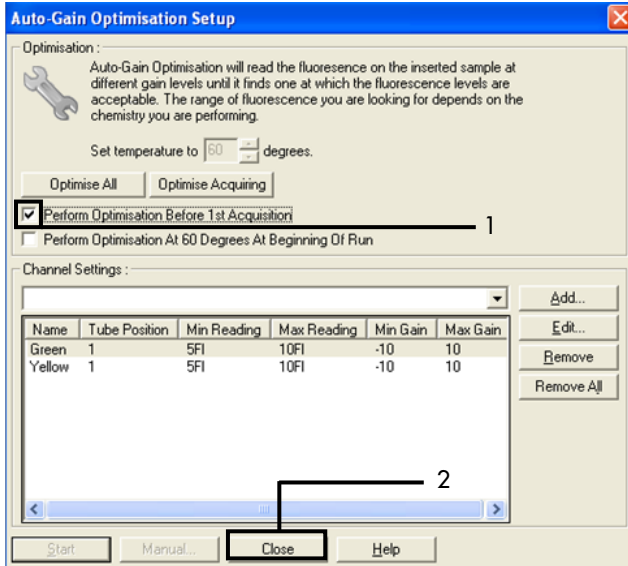


Figure 31. Sélection des canaux Green et Yellow. 1 = case « Perform optimisation Before 1st Acquisition » (Effectuer l'optimisation avant la 1^{re} acquisition) ; 2 = « Close » (Fermer).

15. Cliquer sur Next (Suivant) (figure 32). Cliquer sur Save Template (Enregistrer le modèle) pour enregistrer le modèle du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (fichier *.ret) dans un emplacement approprié.

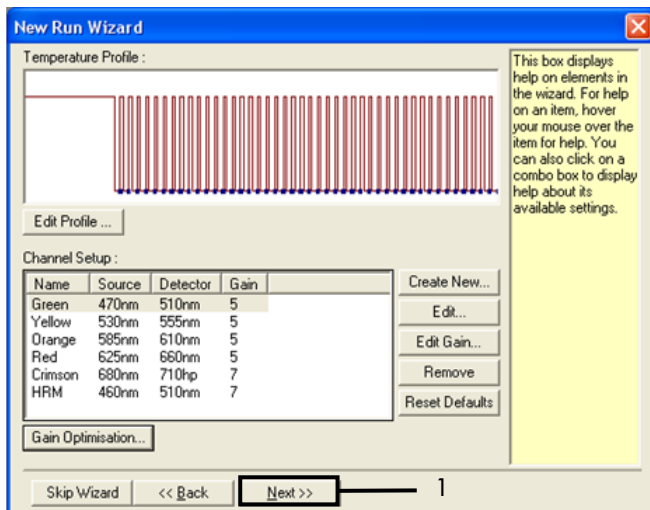


Figure 32. « Next » (Suivant) (1).

Procédure (manuelle)

Protocole : évaluation (manuelle) des échantillons

Ce protocole sert à évaluer l'ADN total amplifiable dans les échantillons et doit être effectué avant l'analyse des mutations d'EGFR.

- Préparer les échantillons comme décrit dans la section « Protocole : évaluation des échantillons » jusqu'à l'étape 11.
- Configurer le cycle de PCR sur l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM comme décrit dans la section « Protocole : configuration du Rotor-Gene Q pour le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ».
- Une fois le cycle terminé, analyser les données conformément aux instructions dans la section « Analyse des données d'évaluation des échantillons ».

Protocole : détection (manuelle) des mutations d'EGFR

- Une fois que l'évaluation d'un échantillon s'avère satisfaisante, celui-ci peut subir les tests de détection des mutations d'EGFR.
- Préparer les échantillons comme décrit dans la section « Protocole : détection des mutations d'EGFR » jusqu'à l'étape 11.
- Configurer le cycle de PCR sur l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM comme décrit dans la section « Protocole : configuration du Rotor-Gene Q pour le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ».
- Une fois le cycle terminé, analyser les données conformément aux instructions dans la section « Analyse des données de détection des mutations d'EGFR ».

Protocole : configuration du Rotor-Gene Q pour le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Procédure

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

Pour les instructions de création du profil de température et de vérification des paramètres des cycles, voir la section « Protocole : création d'un profil de température ».

2. Veiller à ce que le bon rotor soit sélectionné et cocher la case Locking Ring Attached (Bague de verrouillage fixée). Cliquer sur Next (Suivant) (figure 33).

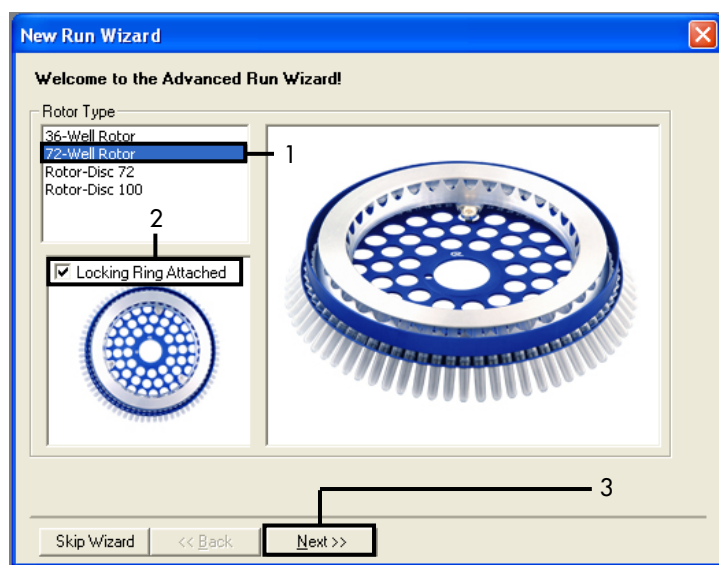


Figure 33. Boîte de dialogue « New Run Wizard » (Assistant nouveau cycle) et écran d'accueil. 1 = « Rotor type » (Type de rotor) ; 2 = case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage fixée) ; 3 = « Next » (Suivant).

3. Saisir le nom de l'opérateur. Ajouter toutes notes éventuelles, vérifier que le volume réactionnel est fixé à 25 et que le champ Sample Layout (Répartition des échantillons) affiche 1, 2, 3.... Cliquer sur Next (Suivant) (figure 34).

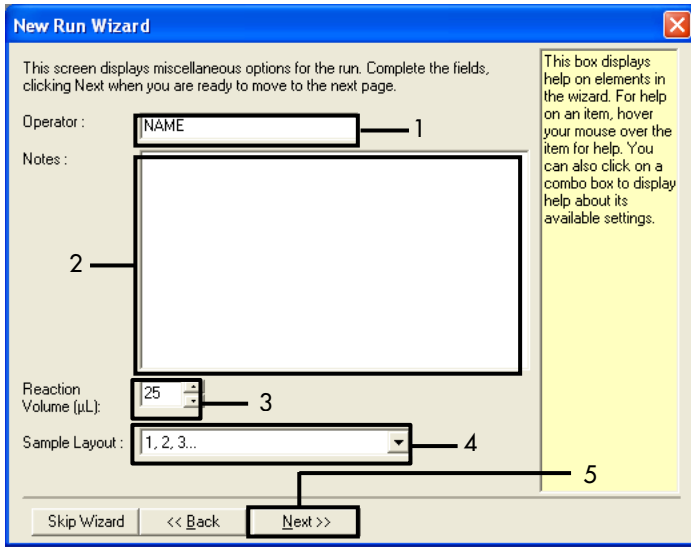


Figure 34. Écran « New Run Wizard » (Assistant nouveau cycle). 1 = « Operator » (Opérateur) ; 2 = champ « Notes » ; 3 = « Reaction Volume » (Volume réactionnel) ; 4 = champ « Sample Layout » (Répartition des échantillons) ; 5 = « Next » (Suivant).

Remarque : la fenêtre suivante permet de modifier le profil de température. (Aucune modification n'est nécessaire, car le profil a été créé conformément aux instructions dans la section « Protocole : création d'un profil de température ».)

4. Cliquer sur Next (Suivant) (figure 35).

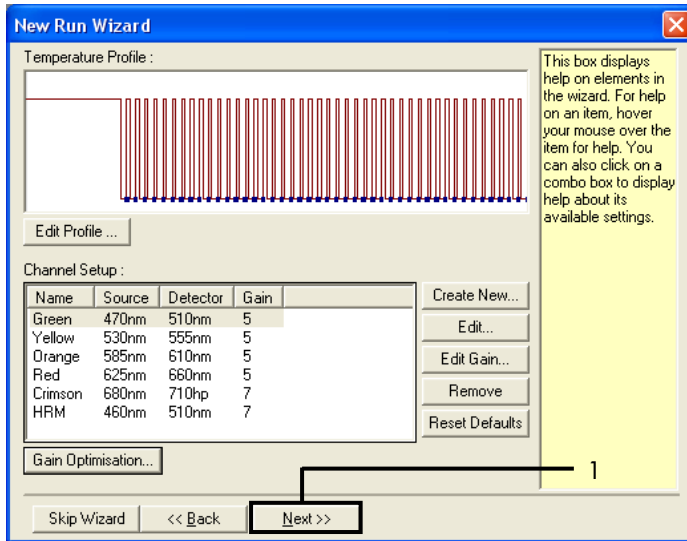


Figure 35. Boîte de dialogue « New Run Wizard » (Assistant nouveau cycle) et écran de modification de la température (1 = « Next » [Suivant]).

5. Vérifier le résumé puis cliquer sur Start Run (Démarrer le cycle) pour enregistrer le fichier de cycle et lancer le cycle (figure 36).

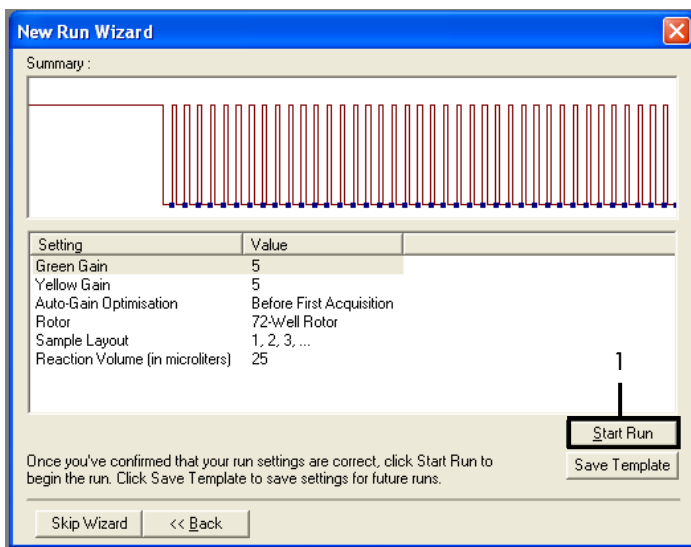


Figure 36. Boîte de dialogue « New Run Wizard » (Assistant nouveau cycle) et écran de résumé (1 = « Start Run » [Démarrer le cycle]).

6. Effectuez l'une des étapes suivantes sur la nouvelle fenêtre qui s'affiche après le lancement du cycle :

- Saisir les noms d'échantillons.
- Cliquer sur Finish (Terminer) et saisir les noms des échantillons ultérieurement. Pour cela, sélectionner Sample (Échantillon) pendant le cycle ou une fois le cycle terminé.

Important : le fait de cliquer sur Finish and Lock Samples (Terminer et verrouiller les échantillons) empêche toute modification ultérieure du nom des échantillons. Faire attention à bien saisir les noms des échantillons pour garantir que les tests et l'analyse sont correctement effectués.

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

7. Une fois le cycle terminé, analyser les données conformément aux sections « Analyse des données d'évaluation des échantillons » ou « Analyse des données de détection des mutations d'EGFR », selon le cas.
8. Si des rapports de quantification sont nécessaires, cliquer sur l'icône Reports (Rapports) dans la barre d'outils du fichier de cycle Rotor-Gene Q.
9. Dans l'explorateur de rapports, cliquer sur Cycling A Green (page 1) sous « Report Categories » (Catégories de rapports) (figure 37).

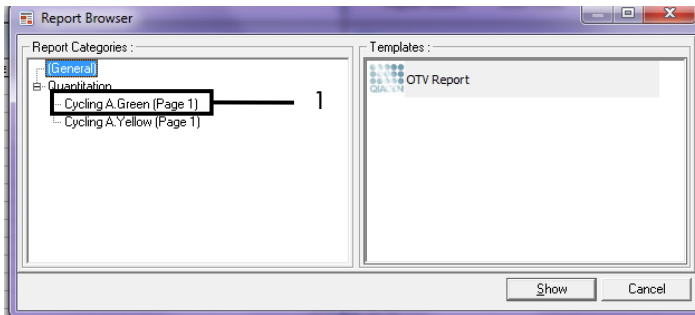


Figure 37. Explorateur de rapports (1 = « Cycling A. Green [Page 1] »).

10. Sélectionner Quantitation (Full Report) (Quantification [rapport complet]) sous « Templates » (Modèles) (figure 38).

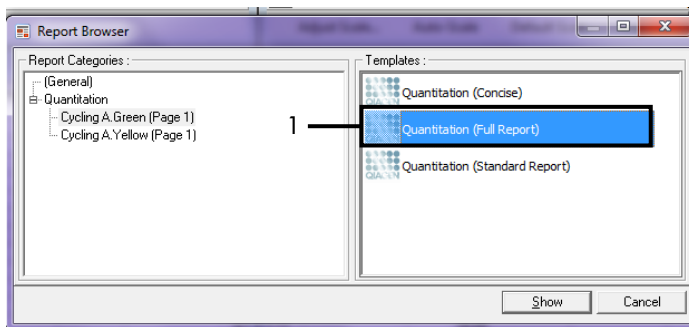


Figure 38. Rapport de quantification (Rapport complet) (1).

-
11. Pour générer le rapport, cliquer sur Show (Afficher).
 12. Cliquer sur Save As (Enregistrer sous) pour en enregistrer une version électronique.
 13. Répéter cette opération pour Cycling A Yellow (Page 1)).

Interprétation des résultats (manuelle)

Une fois terminé le cycle du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (pour l'évaluation des échantillons d'ADN ou l'analyse des mutations d'EGFR), analyser les données conformément aux procédures suivantes :

- Paramètres du logiciel pour l'analyse
- Analyse de l'évaluation des échantillons d'ADN (manuelle)
Remarque : voir le tableau 4 pour la répartition des tubes.
- Analyse de la détection des mutations d'EGFR (manuelle)
Remarque : voir le tableau 7 pour la répartition des tubes.

Paramètres d'analyse du logiciel

1. Ouvrir le fichier de cycle approprié (*.rex) à l'aide du logiciel Rotor-Gene Q version 2.3.
2. Si les échantillons n'ont pas été nommés avant le cycle, cliquer sur Edit Samples (Modifier les échantillons).
3. Insérer le nom des échantillons dans la colonne Name (Nom).
Remarque : les noms des tubes vides doivent rester vierges.
4. Cliquer sur Analysis (Analyse). Sur la page d'analyse, cliquer sur Cycling A Yellow pour vérifier le canal Yellow (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 (Correction de la pente).
8. Sélectionner Linear Scale (Échelle linéaire).

-
9. Sélectionner Take Off Adj (Définition du cycle de quantification) et saisir les valeurs 15.01 dans le champ du dessus (« If take off point was calculated before cycle » [Si le seuil de quantification a été calculé avant le cycle]) et 20.01 dans le champ du dessous (« then use the following cycle and take off point » [alors utiliser le cycle et le seuil de quantification suivant]).
 10. Attribuer au seuil une valeur de 0.02 et vérifier les valeurs de C_T sur le canal Yellow (HEX).
 11. Sur la page d'analyse, cliquer sur Cycling A Green pour afficher le canal Green (FAM).
 12. Sélectionner Named On (Nommé).
 13. Sélectionner Dynamic tube (Tube dynamique).
 14. Sélectionner Slope correct (Correction de la pente).
 15. Sélectionner Linear Scale (Échelle linéaire).
 16. Sélectionner Take Off Adj (Définition du cycle de quantification) et saisir les valeurs 15.01 dans le champ du dessus (« If take off point was calculated before cycle » [Si le seuil de quantification a été calculé avant le cycle]) et 20.01 dans le champ du dessous (« then use the following cycle and take off point » [alors utiliser le cycle et le seuil de quantification suivant]).
 17. Attribuer au seuil une valeur de 0.075 et vérifier les valeurs de C_T sur le canal Green (FAM).

Analyse des données d'évaluation des échantillons

Une fois terminé le cycle d'évaluation des échantillons d'ADN, consulter la section « Paramètres d'analyse du logiciel » et analyser les données comme suit. (Voir le tableau 4 page 25 pour la répartition des tubes.)

Analyse de contrôle de cycle

Contrôle négatif

Pour garantir l'absence de contamination de la matrice, le NTC ne doit pas générer une valeur de C_T inférieure à 40 sur le canal Green (FAM).

Pour garantir le bon paramétrage du cycle, le NTC doit présenter une amplification entre 29,85 et 35,84 sur le canal Yellow (HEX). Les valeurs spécifiées incluent ces valeurs et sont comprises entre elles.

Contrôle positif

Le contrôle positif PC EGFR doit donner une valeur de C_T comprise entre 28,13 et 34,59 sur le canal Green (FAM). Une valeur en dehors de cet intervalle indique un problème de configuration du test. Le cycle a échoué.

Remarque : les données des échantillons ne doivent pas être utilisées si le contrôle positif ou négatif a échoué.

Analyse des échantillons

Si les contrôles de cycle pour l'évaluation des échantillons d'ADN sont valides, l'analyse peut s'effectuer. La valeur de C_T du contrôle pour un échantillon doit être comprise entre 23,70 et 31,10 sur le canal Green (FAM). Si la valeur de C_T de l'échantillon se trouve en dehors de cet intervalle, se conformer aux indications suivantes.

- C_T de test de contrôle d'échantillon <23,70

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

- C_T de test de contrôle d'échantillon >31,10

Il est recommandé d'effectuer une nouvelle extraction des échantillons présentant un contrôle C_T >31,10 sur le canal Green (FAM). La quantité de matrice d'ADN n'est pas suffisante pour détecter toutes les mutations d'EGFR aux valeurs seuils indiquées pour le test.

Analyse des données de détection des mutations d'EGFR

L'évaluation d'un échantillon d'ADN doit s'avérer satisfaisante avant que celui-ci puisse subir les tests de détection des mutations d'EGFR (voir la section « Analyse des données d'évaluation des échantillons »).

Une fois terminé le cycle d'évaluation des mutations d'EGFR, consulter la section « Paramètres d'analyse du logiciel » et analyser les données comme suit. (Voir le tableau 7 pour la répartition des tubes.)

Analyse de contrôle de cycle

Consulter l'organigramme d'analyse des contrôles de cycles dans la figure 39.

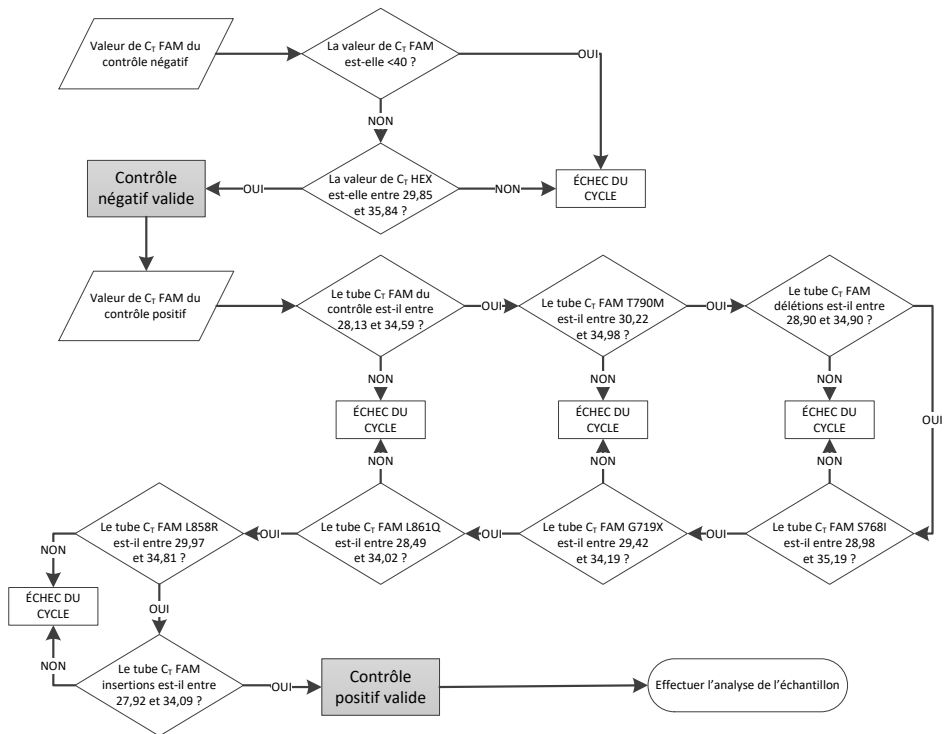


Figure 39. Organigramme d'analyse des contrôles de cycles pour la détection des mutations d'EGFR.

Contrôle négatif

Pour garantir l'absence de contamination de la matrice, le NTC dans chaque test de mutation d'EGFR ne doit pas générer une valeur de C_T inférieure à 40 sur le canal Green (FAM).

Pour garantir le bon paramétrage du cycle, le NTC doit présenter une amplification entre 29,85 et 35,84 sur le canal Yellow (HEX). Les valeurs spécifiées incluent ces valeurs et sont comprises entre elles.

Contrôle positif

Pour chacun des tests de mutations d'EGFR, le contrôle positif PC EGFR doit donner une valeur de C_T sur le canal Green (FAM) comprise dans l'intervalle indiqué dans le tableau 16. Une valeur en dehors de cet intervalle indique un problème de configuration du test. Le cycle a échoué.

Remarque : les données des échantillons ne doivent pas être utilisées si le contrôle de cycle positif ou négatif a échoué.

Tableau 16. Intervalles de C_T acceptables pour les contrôles positifs des réactions (test de détection des mutations d'EGFR)

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

Analyse des échantillons : valeur de C_T sur le canal Green (FAM) du contrôle d'échantillon

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

La valeur de C_T du contrôle pour un échantillon sur le canal Green (FAM) doit être comprise entre 23,70 et 31,10. (Voir le tableau 7 pour la répartition des tubes.)

Si la valeur de C_T du contrôle d'échantillon se trouve en dehors de cet intervalle, se conformer aux indications suivantes.

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

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

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

Il est recommandé d'effectuer une nouvelle extraction des échantillons présentant un contrôle $C_T >31,10$ sur le canal Green (FAM). La quantité de matrice d'ADN n'est pas suffisante pour détecter toutes les mutations d'EGFR aux valeurs seuils indiquées pour le test.

Consulter l'organigramme d'analyse des échantillons pour la détection des mutations d'EGFR dans la figure 40.

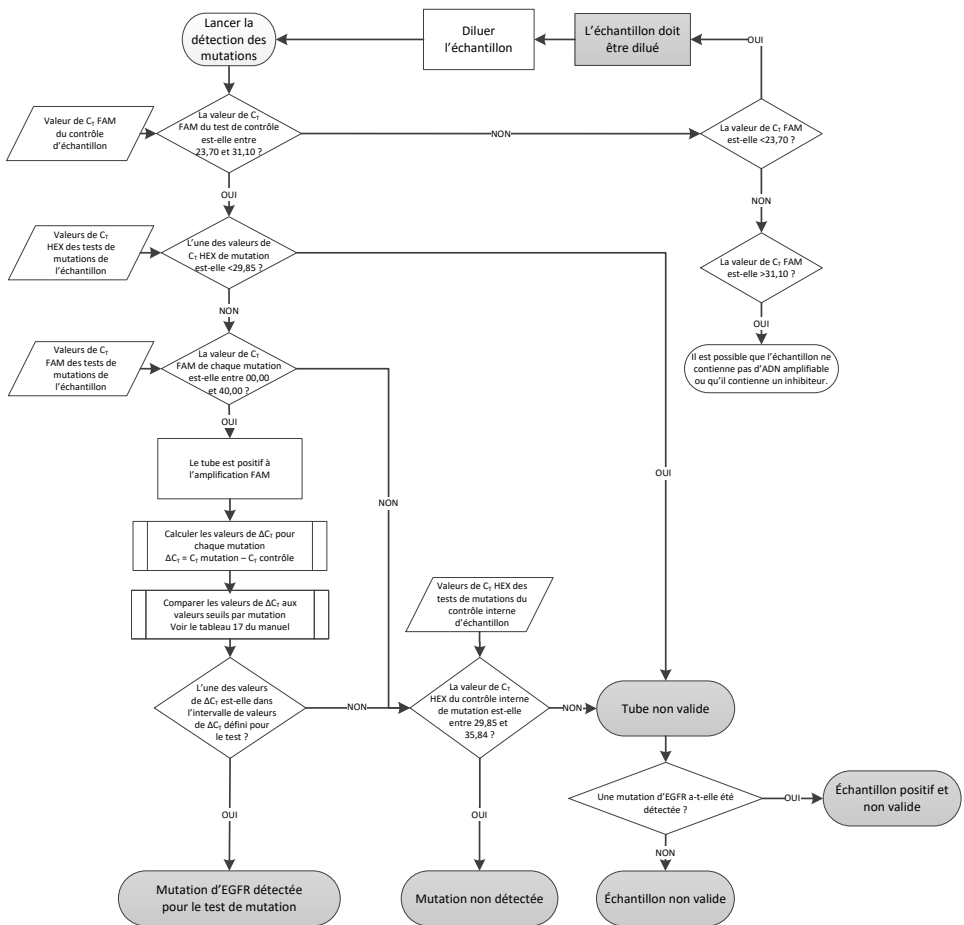


Figure 40. Organigramme d'analyse des échantillons pour la détection des mutations d'EGFR.

Analyse des échantillons : valeur de C_T du contrôle interne d'échantillon sur le canal Yellow (HEX)

Remarque : consulter l'organigramme d'analyse des échantillons pour la détection des mutations d'EGFR dans la figure 40.

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

- Si le C_T du contrôle interne est en deçà de l'intervalle spécifié (<29,85) pour n'importe quel test de mutation, le résultat est non valide pour l'amplification sur le canal Yellow (HEX). L'amplification sur canal Yellow (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 sur le canal Yellow (HEX).
L'amplification sur le canal Yellow (HEX) pour ce tube est valide.
- Si le C_T du contrôle interne est au-delà de l'intervalle spécifié (>35,84), le résultat est négatif pour l'amplification sur le canal Yellow (HEX).

S'il y a une amplification sur le canal Green (FAM) et que la valeur de ΔC_T pour cette réaction est inférieure ou égale à la valeur seuil du test pour ce tube, l'amplification sur le canal Yellow (HEX) est valide. S'il n'y a pas d'amplification sur le canal Green (FAM) pour ce tube ou si une valeur de ΔC_T est supérieure à la valeur seuil du test, l'amplification sur le canal Yellow (HEX) n'est pas valide.

L'amplification du contrôle interne sur le canal Yellow (HEX) peut échouer en raison de l'inhibition de la PCR. La dilution de l'échantillon peut réduire l'effet des inhibiteurs. Il faut tenir compte du fait que cela 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 de C_T sur le canal Green (FAM) des tests de mutations d'échantillons

Les valeurs du canal Green (FAM) pour les sept mélanges réactionnels de mutations d'EGFR doivent être vérifiées par rapport à celles du tableau 17. Les valeurs spécifiées incluent ces valeurs et sont comprises entre elles. (Voir le tableau 7 pour la répartition des tubes.)

Tableau 17. Valeurs acceptables pour les réactions de mutations d'EGFR des échantillons sur le canal Green (FAM) (test de détection des mutations d'EGFR)

| Test | Intervalle de C_T | Seuil (ΔC_T) |
|------------|---------------------|------------------------|
| T790M | 0,00 à 40,00 | $\leq 7,40$ |
| Délétions | 0,00 à 40,00 | $\leq 8,00$ |
| L858R | 0,00 à 40,00 | $\leq 8,90$ |
| L861Q | 0,00 à 40,00 | $\leq 8,90$ |
| G719X | 0,00 à 40,00 | $\leq 8,90$ |
| S768I | 0,00 à 40,00 | $\leq 8,90$ |
| Insertions | 0,00 à 40,00 | $\leq 8,00$ |

- Si la valeur de C_T sur le canal Green (FAM) pour l'échantillon est conforme à l'intervalle spécifié, l'échantillon est positif à l'amplification FAM.
- Si la valeur de C_T sur le canal Green (FAM) est au-delà de l'intervalle spécifié ou s'il n'y a aucune amplification, l'échantillon est négatif à l'amplification FAM.

Calculer la valeur de ΔC_T pour chaque tube de détection de mutations d'EGFR positif à l'amplification FAM comme suit, en veillant à ce que les valeurs de C_T des tests de contrôle et de mutations proviennent du même échantillon. (Voir le tableau 7 pour la répartition des tubes.)

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

Comparer la valeur de ΔC_T pour l'échantillon avec le point seuil du test en question (table 17). Veiller à appliquer le point seuil correct.

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

Le statut de chaque réaction de mutation pour chacun des échantillons peut être l'un des suivants :

- Mutation détectée
- Mutation non détectée
- Non valide

Mutation détectée

L'amplification sur le canal Green (FAM) est positive et la valeur de ΔC_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 sur le canal Green (FAM) est positive et la valeur de ΔC_T est supérieure à la valeur seuil.

L'amplification sur le canal Green (FAM) est négative et l'amplification sur le canal Yellow (HEX) (contrôle interne) est positive.

Non valide

L'amplification sur le canal Yellow (HEX) (contrôle interne) est non valide.

L'amplification sur le canal Green (FAM) est négative et l'amplification sur le canal Yellow (HEX) (contrôle interne) est négative.

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

Annexe B : installation du *therascreen* EGFR CE Assay Package

Le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit est conçu pour une utilisation avec l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM et un rotor à 72 puits. Le *therascreen* EGFR CE Assay Package est disponible sur CD séparément (référence catalogue 9023537). Le package inclut les modèles « *therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template » (Modèle verrouillé de cycle de contrôle du *therascreen* EGFR CE) et « *therascreen* EGFR CE Locked Template » (Modèle verrouillé du *therascreen* EGFR CE).

Remarque : le *therascreen* EGFR CE Assay Package est compatible uniquement avec le logiciel RotorGene Q version 2.3. Vérifier que la bonne version du logiciel RotorGene Q est installée avant de poursuivre l'installation du *therascreen* EGFR CE Assay Package. Si l'appareil Rotor-Gene Q MDx a été fourni avec une version du logiciel antérieure, effectuer la mise à niveau en téléchargeant le logiciel Rotor-Gene Q version 2.3 depuis la page produit du Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (dans la section « Product Resources » [Ressources produit] sous « Operating Software » [Logiciel d'exploitation] ; voir www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources).

Procédure

1. Commander le CD du *therascreen* EGFR CE Assay Package (référence catalogue 9023537).
2. Insérer le CD dans le lecteur CD de l'ordinateur connecté à l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
3. Si le CD se lance automatiquement, double-cliquer sur `therascreen_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.5.exe` pour démarrer l'installation.

Dans le cas contraire, repérer et lancer ce fichier exécutable à l'aide de l'explorateur de fichiers sur l'ordinateur connecté.

L'assistant d'installation du *therascreen* EGFR CE Assay Package s'ouvre.

4. Cliquer sur Next (Suivant) pour continuer (figure 41).

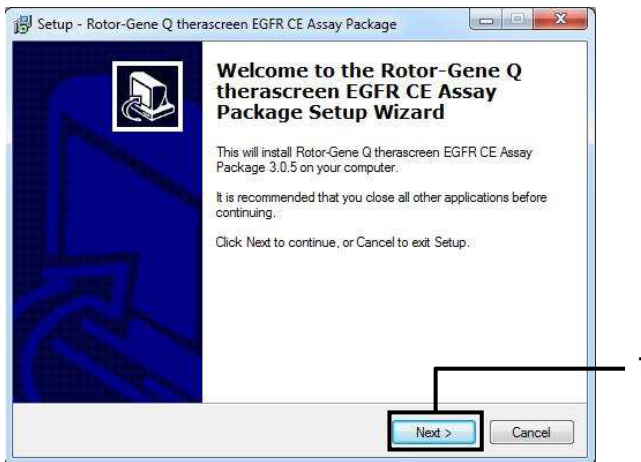


Figure 41. Boîte de dialogue du Setup Wizard (Assistant d'installation) (1 = « Next » [Suivant]).

5. Lire le License Agreement (Contrat de licence) dans la boîte de dialogue et cocher la case I accept the agreement (J'accepte le contrat). Cliquer sur Next (Suivant) pour continuer (figure 42).

L'installation démarre automatiquement.

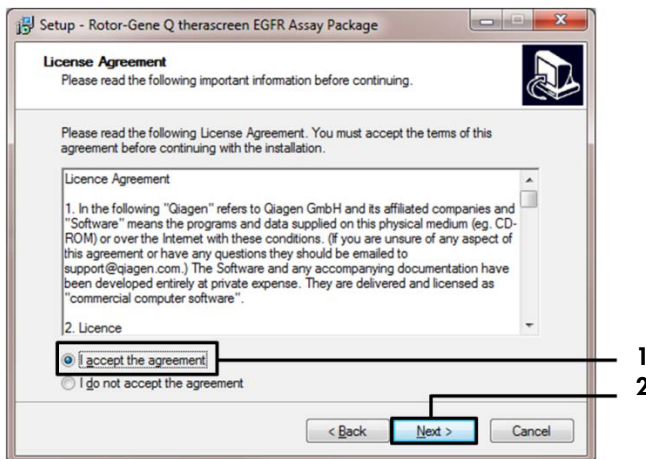


Figure 42. Boîte de dialogue « License Agreement » (Contrat de licence). 1 = « I accept the agreement » (J'accepte le contrat) ; 2 = « Next » (Suivant).

6. Une fois l'installation terminée, cliquer sur Finish (Terminer) dans la dernière boîte de dialogue de Setup Wizard (assistant d'installation) (figure 43).

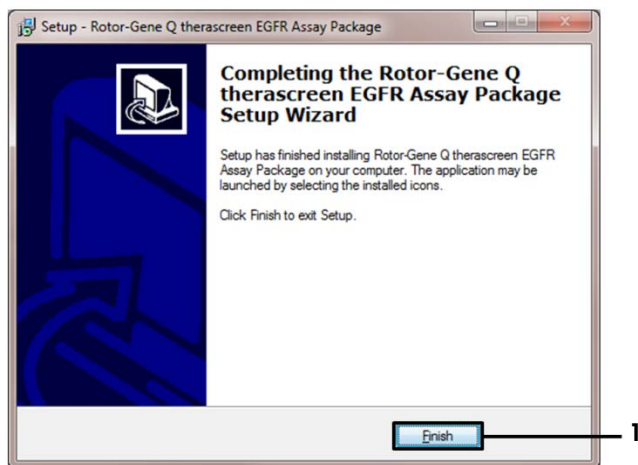


Figure 43. Fin de l'installation (1 = « Finish » [Terminer]).

7. Redémarrer l'ordinateur.

Les raccourcis des modèles « *thetascreen* EGFR CE Control Run Locked Template » (Modèle verrouillé de cycle de contrôle du *thetascreen* EGFR CE) et « *thetascreen* EGFR CE Locked Template » (Modèle verrouillé du *thetascreen* EGFR CE) sont générés automatiquement et s'affichent sur le bureau (figure 44).

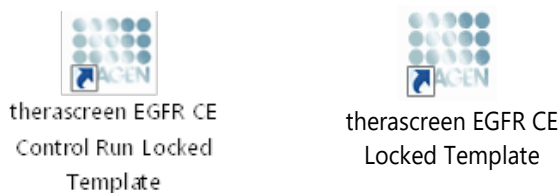


Figure 44. Icônes des modèles « EGFR CE Control Run Locked Template » (Modèle verrouillé de cycle de contrôle du EGFR CE) et « EGFR CE Locked Template » (Modèle verrouillé du EGFR CE).

Coordonnées

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

Informations pour commander

| Produit | Contenu | Réf. cat. |
|--|---|-----------|
| <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24) | Pour 24 réactions : test de contrôle, 7 tests de mutations, contrôle positif, Taq ADN polymérase, eau pour NTC et eau pour dilution d'échantillons | 874111 |
| <i>therascreen</i> EGFR Assay Package CD | Package de protocole logiciel conçu pour une utilisation avec le <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit et l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM de QIAGEN | 9023537 |
| QIAamp DNA FFPE Tissue Kit | | |
| QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50) | Pour 50 préparations d'ADN : colonnes QIAamp MinElute®, protéinase K, tampons et Collection Tubes (2 ml) | 60404 |
| QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) | Pour 50 préparations : 50 colonnes QIAamp MinElute, protéinase K, tampons et Collection Tubes (2 ml) | 56404 |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM et accessoires | | |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System | Thermocycleur de real-time PCR et analyseur de fusion à haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation | 9002033 |

| Produit | Contenu | Réf. cat. |
|-------------------------------------|---|-----------|
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform | Thermocycleur de real-time PCR et analyseur de fusion à haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation non comprises | 9002032 |
| Loading Block 72 x 0.1ml Tubes | Bloc en aluminium pour préparation manuelle des réactions à l'aide d'une pipette monocanal dans 72 tubes de 0,1 ml | 9018901 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250) | 250 barrettes de 4 tubes et bouchons pour 1 000 réactions | 981103 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500) | 10 x 250 barrettes de 4 tubes et bouchons pour 10 000 réactions | 981106 |

Pour les dernières informations sur les licences et les clauses limitatives de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques de QIAGEN ou de votre distributeur local.

Historique des révisions du document

| Date | Modifications |
|------------------|---|
| R4, mars 2018 | <p>Modification des durées de stockage de préparation pour clarifier la durée de décongélation et la durée totale dans la section « Conditions de stockage » et dans les tableaux 2 et 5.</p> <p>Réactualisation de la figure 40. Organigramme d'analyse des échantillons pour la détection des mutations d'EGFR.</p> <p>Ajout d'informations pour commander le QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit (référence catalogue 60404).</p> |
| R5, janvier 2019 | <p>Ajout du représentant agréé (première de couverture).</p> <p>Réactualisation de la section « Symboles ».</p> |
| R6, octobre 2019 | <p>Modification du fabricant légal (première de couverture).</p> <p>Adaptation du nom de l'appareil de Rotor-Gene Q MDx à Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM pour le faire correspondre à l'étiquette sur l'appareil.</p> <p>Ajout d'une condition de stockage des réactifs dans la section « Stockage et manipulation des réactifs ».</p> <p>Réactualisation du tableau 1 pour ajouter une remarque sur la suppression de COSM6254 dans la base de données de COSMIC.</p> <p>Réactualisation de la section « Limitations » avec les informations sur le test des délétions dans l'exon 19 et le test de L858R.</p> <p>Suppression du symbole EC + REP sur la première de couverture et dans la section « Symboles ».</p> |

Contrat de licence limitée pour le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

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

1. Le produit doit être utilisé uniquement avec les composants du kit, conformément aux protocoles fournis et à ce manuel. 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. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour les utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenue 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 portent pas atteinte aux droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes autres licences, expresses ou tacites, 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 ce contrat 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 de procédure en application de ce contrat de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

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

Marques commerciales : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, RoboGene®, Scorpions®, *therascreen*® (groupe QIAGEN) ; FAM1™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) ; GIOTRIE® (Boehringer Ingelheim) ; IRESSA® (groupe AstraZeneca). Les noms déposés, les marques commerciales, etc. cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

Le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit est un kit de diagnostic homologué CE conforme à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. Disponible dans certains pays uniquement.

1119191 10/2019 HB-1909-006 © 2019 QIAGEN, tous droits réservés.

