

Avril 2022

Mode d'emploi (manuel) du *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR Kit



Version 1



Diagnostics qualitatifs in vitro

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

Pour une utilisation avec le QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit



874011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, ALLEMAGNE



1127513FR

Sommaire

Utilisation prévue.....	5
Résumé et explication.....	6
Principe de la procédure.....	7
Matériel fourni.....	11
Contenu du kit.....	11
Matériel nécessaire, mais non fourni.....	12
Avertissements et précautions.....	14
Informations de sécurité.....	14
Précautions générales.....	14
Stockage et manipulation des réactifs.....	16
Prélèvement d'échantillons, préparation à l'analyse et stockage.....	17
Procédure.....	19
Protocole : évaluation des échantillons d'ADN.....	22
Interprétation (manuelle) des résultats.....	35
Paramètres d'analyse du logiciel.....	35
Analyse des données d'évaluation de l'échantillon.....	36
Analyse des échantillons.....	39
Protocole : détection des mutations KRAS.....	45
Interprétation des résultats.....	60
Analyse et détection des mutations.....	60
Limitations.....	62
Caractéristiques des performances.....	63

Performances analytiques	63
Seuil	63
Limite du blanc.....	64
Comparaison avec la méthode d'analyse de référence : CCR.....	64
Comparaison avec la méthode d'analyse de référence : CPNPC	66
Limite de détection (Limit of Detection, LoD)	68
Quantité d'ADN introduit et linéarité	70
Substances interférentes	75
Contamination croisée	76
Exclusivité/réactivité croisée	77
Répétabilité et reproductibilité.....	80
Variabilité dans la manipulation des échantillons	92
Équivalence des méthodes d'acquisition des échantillons (CPNPC uniquement).....	94
Performances cliniques.....	97
Guide de dépannage.....	105
Indicateurs d'erreurs générés par le <i>therascreen</i> KRAS Assay Package.....	106
Contrôle de la qualité	112
Références	113
Symboles.....	116
Coordonnées	117
Annexe 1: protocole manuel du <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit.....	118
Annexe 2 : installation du <i>therascreen</i> KRAS Assay Package	135
Informations pour commander.....	139
Historique des révisions du document.....	141

Utilisation prévue

Le *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR Kit est un dosage qualitatif par real-time PCR permettant de détecter 7 mutations somatiques dans les codons 12 et 13 de l'oncogène KRAS humain à l'aide de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Ce kit est conçu pour une utilisation avec de l'ADN extrait de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) de cancer colorectal (CCR) ou de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) acquis par résection, biopsie au trocart (BAT) ou biopsie d'aspiration à l'aiguille fine (BAAF).

Les mutations somatiques dans le gène KRAS sont des biomarqueurs pouvant potentiellement permettre de prédire la résistance aux médicaments ciblant le récepteur du facteur de croissance épidermique humain (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), tels que le panitumumab et le cétuximab pour le traitement du CCR. Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est également destiné à faciliter l'identification des patients CPNPC pour un traitement par sotorasib (LUMYKRAS[®]) sur la base d'un résultat de détection de mutation KRAS G12C.

Les mutations somatiques dans le gène KRAS peuvent aussi potentiellement être des biomarqueurs prédictifs facilitant la prise de décision d'autres traitements du CPNPC.

Le clinicien doit prendre en compte le statut mutationnel du patient à la lumière d'autres aspects de la maladie avant de parvenir à une décision de traitement. Aucune décision de traitement pour les patients avec cancer ne doit s'appuyer uniquement sur le statut mutationnel du gène KRAS.

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

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est un dispositif médical de diagnostic in vitro.

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit doit être utilisé par un personnel qualifié, dans un environnement de laboratoire professionnel.

Résumé et explication

Les mutations de l'oncogène KRAS sont fréquemment observées dans les cancers humains (1–4). Grâce aux technologies ARMS® (Allele Refractory Mutation System) et Scorpions® (5, 6), le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit permet de détecter 7 mutations dans les codons 12 et 13 de l'oncogène KRAS en présence d'un fond d'ADN génomique de type sauvage (tableau 1). D'après la base de données COSMIC (2015 v72), les 7 mutations détectées par le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit représentent > 95 % des mutations KRAS rapportées chez les patients avec CCR et > 88 % des mutations rapportées chez les patients avec CPNPC (7).

Tableau 1. Liste des mutations et des identifiants COSMIC

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

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

Le test, très spécifique et sensible, permet la détection d'un faible pourcentage d'ADN mutant en présence d'un bruit de fond d'ADN de type sauvage. À condition qu'il y ait suffisamment de copies d'ADN, la détection de 0,8 % de mutants dans le bruit de fond d'un ADN génomique de type sauvage est possible.

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est utilisé dans le cadre d'une procédure d'amplification en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR). Le kit présente l'avantage d'être rapide, efficace et hautement spécifique à la cible, ainsi que de prévenir toute subjectivité dans la détermination des résultats.

Principe de la procédure

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit utilise 2 technologies (ARMS et Scorpions) pour la détection des mutations dans la real-time PCR.

Mélanges réactionnels de mutations

Chaque mélange réactionnel utilise une amorce ARMS spécifique à une mutation afin d'amplifier l'ADN muté de façon sélective, puis une amorce Scorpions afin de détecter le produit d'amplification.

ARMS

L'amplification spécifique à un allèle donné s'effectue à l'aide de la technologie ARMS, qui exploite la capacité de la *Taq* ADN polymérase à distinguer entre un appariement et un mésappariement à l'extrémité 3' d'une amorce de PCR. 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. Par conséquent, une séquence mutée est amplifiée sélectivement, même dans les échantillons où la majorité de l'ADN ne porte pas la mutation.

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. La sonde contient le fluorophore carboxyfluorescéine (FAM™) et un quencher. Ce dernier entraîne l'extinction de la fluorescence du fluorophore. Lorsque la sonde s'hybride à l'amplicon ARMS au cours de la PCR, le fluorophore et le quencher se séparent, entraînant une augmentation détectable de la fluorescence.

Format du kit

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit contient 8 dosages :

- 1 dosage de contrôle (mélange réactionnel de contrôle [CTRL])
- 7 dosages de mutations (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

Les mélanges réactionnels contiennent à la fois des réactifs marqués FAM pour détecter les cibles et des réactifs marqués HEX™ pour détecter les contrôles internes. Les mélanges réactionnels et les réactifs de contrôles positifs contiennent du tampon Tris EDTA. Le contrôle positif contient l'ARN vecteur polyA.

Dosages

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit implique une procédure en 2 étapes. Lors de la première étape, le dosage de contrôle est effectué afin d'évaluer l'ADN KRAS amplifiable total dans l'échantillon. Lors de la seconde étape, les dosages des mutations et de contrôle sont effectués pour déterminer la présence ou l'absence d'ADN mutant.

Réaction de contrôle

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

Dosage de contrôle

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

Dosages de mutations

Chaque dosage de mutation contient une sonde Scorpions marquée 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 interne

Chaque mélange réactionnel contient un contrôle interne en plus de la réaction cible. Un échec indique la présence éventuelle d'inhibiteurs, qui sont susceptibles d'entraîner un résultat inexact, ou la survenue d'une erreur de préparation de l'opérateur pour ce tube. En cas d'échec du contrôle interne dû à l'inhibition de la PCR, la dilution de l'échantillon peut réduire l'effet des inhibiteurs. Cependant, il faut tenir compte du fait que cela entraîne également la dilution de l'ADN cible. Un tube d'eau pour dilution d'échantillons (Dil.) est fourni avec le kit. La dilution des échantillons doit être effectuée avec l'eau pour dilution d'échantillons (Dil.).

Contrôle positif

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

Contrôle négatif

Chaque cycle doit contenir un contrôle négatif (Contrôle sans matrice) dans les tubes 9 à 13. Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit contient de l'eau pour contrôle sans matrice à utiliser en tant que matrice pour le contrôle sans matrice. Le contrôle sans matrice est utilisé pour détecter toute contamination potentielle durant la préparation des cycles et pour évaluer les performances de la réaction du contrôle interne.

Évaluation de l'échantillon

Le mélange réactionnel de contrôle (CTRL) fourni avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est utilisé pour évaluer l'ADN amplifiable total du gène KRAS présent dans un échantillon. Ce dosage de contrôle amplifie une région de l'exon 4 du gène KRAS. Il est recommandé de préparer les échantillons uniquement avec le dosage de contrôle, en utilisant le contrôle positif KRAS (Positive Control, PC) comme contrôle positif et de l'eau pour contrôle sans matrice comme contrôle négatif.

Plateforme et logiciel

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est conçu spécifiquement pour une utilisation avec l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Le logiciel du Rotor-Gene Q et le *therascreen* KRAS Assay Package sont disponibles au téléchargement sur Internet à l'adresse www.qiagen.com ou séparément sur CD.

- Consulter Matériel nécessaire, mais non fourni, page 12, pour obtenir les versions compatibles du logiciel RGQ et du *therascreen* KRAS Assay Package.
- Consulter le manuel d'utilisation de l'appareil pour toute information concernant l'appareil.
- Afin de minimiser les indicateurs pour les contrôles et les échantillons, il convient de respecter strictement le *mode d'emploi du therascreen KRAS RGQ PCR Kit* en ce qui concerne le positionnement de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM conformément aux procédures d'installation et aux exigences propres au site.
- Consulter l'Annexe 2 : installation du *therascreen* KRAS Assay Package, page 135, pour obtenir des instructions sur l'installation du logiciel Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package.

Les appareils Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM doivent être entretenus conformément aux instructions du manuel d'utilisation. Consulter le manuel d'utilisation pour toute information concernant l'appareil.

Voir Annexe 2 : installation du *therascreen* KRAS Assay Package pour les instructions d'installation.

Matériel fourni

Contenu du kit

<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit				(24)
N° de réf.				874011
Nombre de préparations		Identification des tubes		24
Couleur	Désignation			Volume
Rouge	Control Reaction Mix (Mélange réactionnel de contrôle)	1	CTRL	2 x 600 µl
Violet	12ALA Reaction Mix (Mélange réactionnel 12ALA)	2	12ALA	600 µl
Orange	12ASP Reaction Mix (Mélange réactionnel 12ASP)	3	12ASP	600 µl
Rose	12ARG Reaction Mix (Mélange réactionnel 12ARG)	4	12ARG	600 µl
Vert	12CYS Reaction Mix (Mélange réactionnel 12CYS)	5	12CYS	600 µl
Jaune	12SER Reaction Mix (Mélange réactionnel 12SER)	6	12SER	600 µl
Gris	12VAL Reaction Mix (Mélange réactionnel 12VAL)	7	12VAL	600 µl
Bleu	13ASP Reaction Mix (Mélange réactionnel 13ASP)	8	13ASP	600 µl
Beige	KRAS Positive Control (Contrôle positif KRAS)	9	PC	250 µl
Menthe	Taq DNA Polymerase (Taq ADN polymérase)	<i>Taq</i>		80 µl
Blanc	Water for NTC (Eau pour contrôle sans matrice)	NTC		1,9 ml
Blanc	Water for Sample Dilution (Eau pour dilution de l'échantillon)	Dil.		1,9 ml
Manuel du <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (manuel en anglais)				1

Matériel nécessaire, mais non fourni

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

Réactifs

- QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (N° de réf. 56404)
- Xylène
- Éthanol (96-100 %)*

Consommables

- Pointes de pipette stériles avec filtres (pour éviter la contamination croisée, il est recommandé d'utiliser des pointes de pipette avec barrières antiaérosols)
- Tubes de microcentrifugeuse stériles pour la préparation des mélanges principaux
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps pour utilisation avec un 72-well rotor (N° de réf. 981103 ou 981106)

Équipement

- 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 2.3.1 ou supérieure avec le KRAS Assay Package (version 3.0.3) installé pour la détection automatique des mutations

* Ne pas utiliser d'alcool dénaturé contenant d'autres substances telles que du méthanol ou de la butanone.

Remarque : le logiciel Rotor-Gene Q peut être utilisé sans le KRAS Assay Package pour la détection manuelle des mutations. Voir Annexe 1: protocole manuel du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

- Thermomixeur*, incubateur orbital chauffé, bloc chauffant ou bain-marie capable d'incuber à 56 °C et 90 °C
- Centrifugeuse de paillasse† avec rotor pour tubes de 1,5 ml
- Agitateur vortex de paillasse†
- Pipettes dédiées (réglables) pour la préparation des échantillons‡
- Pipettes dédiées (réglables) pour la préparation des mélanges principaux PCR*
- Pipettes dédiées (réglables) pour la distribution de l'ADN matrice*

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

† Ne pas utiliser d'alcool dénaturé contenant d'autres substances telles que du méthanol ou de la butanone.

Avertissements et précautions

Pour utilisation en diagnostic in vitro

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

Pour utilisation avec le QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, porter systématiquement une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consultez 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.

Précautions générales

L'utilisateur doit toujours faire attention aux éléments suivants lors de l'utilisation du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit :

- Le test est destiné à une utilisation avec des prélèvements de tissu fixé au formaldéhyde et inclus en paraffine.
- 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.
- Jeter les échantillons et les dosages usagés conformément aux procédures de sécurité locales.
- Les réactifs du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sont 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 + échantillon) inférieurs à 25 µl.

- Tous les réactifs du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ont été formulés pour être utilisés spécifiquement avec les tests fournis dans le kit.
- Tous les réactifs fournis dans le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs du même *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Ne pas interchanger les réactifs des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits, car cela peut affecter les performances.
- Utiliser uniquement la *Taq* ADN polymérase (tube *Taq*) fournie dans le *therascreen* KRAS 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 mal conservés.
- Afin de minimiser les indicateurs pour les contrôles et les échantillons, il convient de respecter strictement les instructions données dans le *mode d'emploi du therascreen KRAS RGQ PCR Kit*, y compris, mais sans s'y limiter, les consignes suivantes :
 - Un mélange correct des réactifs est nécessaire et doit être assuré à chaque étape de mélange pendant la configuration du dosage.
 - Positionnement de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM conformément aux procédures d'installation et aux exigences propres au site.

Remarque : faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination des réactifs des mélanges réactionnel et de contrôle avec le matériel synthétique contenu dans le réactif de contrôle positif.

Remarque : utiliser des pipettes individuelles et dédiées pour préparer les mélanges réactionnels et ajouter les réactifs de contrôles positifs.

Remarque : effectuer la préparation et la distribution des mélanges réactionnels dans une zone séparée de celle de l'ajout du contrôle positif.

Remarque : ne pas ouvrir l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM avant la fin du cycle.

Remarque : ne pas ouvrir les tubes Rotor-Gene Q une fois le cycle terminé.

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

Stockage et manipulation des réactifs

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est expédié sur un lit de carboglace. Si l'un des composants du *therascreen* KRAS 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 l'un des Services techniques ou l'un des distributeurs locaux de QIAGEN (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Le *therascreen* KRAS 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. Comme toutes les molécules marquées en fluorescence, les sondes Scorpions doivent être protégées de la lumière pour éviter tout photoblanchiment ou toute perte de performances.

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

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

Remarque : tous les échantillons doivent être 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 sont hétérogènes et les données d'un échantillon tumoral peuvent ne pas correspondre à 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* KRAS RGQ PCR Kit.

Préparation des échantillons de tissu

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

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

Préparation des échantillons de tissu pour l'extraction d'ADN sur des tissus de CCR

- À l'aide de méthodes et de matériel standard, fixer le prélèvement de tissu dans du formol neutre tamponné (FNT) 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 déposer sur des lames en verre.
- Un professionnel expérimenté (p. ex. un pathologiste) doit évaluer une coupe colorée à l'hématoxyline-éosine (H&E) afin de déterminer le contenu tumoral et d'en mesurer la surface. Marquer la lame colorée pour distinguer le tissu tumoral du tissu sain. Utiliser les coupes sériées pour l'extraction d'ADN.
- Utiliser des coupes pour lesquelles le contenu tumoral représente > 20 % de la surface pour un traitement sans macrodissection (voir ci-dessous).

- Pour les coupes dont le contenu tumoral représente $\leq 20\%$ de la surface, effectuer une macrodissection d'une ou plusieurs coupes. Éliminer le tissu non tumoral.
- Pour les coupes dont la surface est $< 4\text{ mm}^2$, effectuer le traitement sur au moins 2 coupes pour augmenter la surface tumorale totale jusqu'à un minimum de 4 mm^2 (cela s'applique aux échantillons avec et sans macrodissection). Éliminer le tissu non tumoral.
- Nettoyer l'excédent de paraffine du tissu en grattant avec un nouveau scalpel stérile.

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

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

Préparation des échantillons de tissu pour l'extraction d'ADN sur des tissus NSCLC

- À l'aide de méthodes et de matériel standard, fixer le prélèvement de tissu dans du FNT à 10% et l'inclure en paraffine. À l'aide d'un microtome, faire des coupes sériées de $5\text{ }\mu\text{m}$ dans le bloc de paraffine et les déposer sur des lames en verre.
- Un professionnel expérimenté (p. ex. un pathologiste) doit évaluer une coupe H&E afin d'en déterminer le contenu tumoral. Utiliser les coupes sériées pour l'extraction d'ADN.
- Nettoyer l'excédent de paraffine du tissu en grattant avec un nouveau scalpel stérile.
- Marquer, manipuler et conserver les prélèvements tumoraux, blocs, lames, échantillons et tubes de microcentrifugeuse prêts à l'extraction de manière contrôlée conformément aux procédures locales.

Conservation des prélèvements

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

L'ADN génomique peut être conservé entre 2 et $8\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 1 semaine après l'extraction, puis entre -25 et $-15\text{ }^\circ\text{C}$ pendant un maximum de 8 semaines avant l'utilisation.

Procédure

Extraction de l'ADN pour les échantillons de CCR

Utiliser le QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, N° de réf. 56404) avec les modifications de protocole indiquées ci-dessous pour la purification de l'ADN génomique d'échantillons préparés à partir de prélèvements FFPE de tissus de CCR.

Remarque : le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a été validé à l'aide d'ADN extrait au moyen du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Ne pas utiliser d'autre produit d'extraction de l'ADN.

Procéder à l'extraction de l'ADN conformément aux instructions du manuel du *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* (Version 1) en prenant en compte les remarques suivantes :

- Consulter le manuel du *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* pour la préparation des échantillons avant l'extraction de l'ADN.
- Le QIAamp DNA FFPE Tissue Kit doit être utilisé uniquement de façon manuelle.
- Ne pas effectuer l'étape de RNase décrite dans le *manuel du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Ne pas utiliser la Deparaffinization Solution QIAGEN fournie dans le QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Pour le déparaffinage, utiliser uniquement la méthode au xylène ou à l'éthanol décrite dans le *manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue*.
- Utiliser de l'éthanol de qualité biologie moléculaire pour toutes les étapes requises.*
- Utiliser 1 lame par extraction.
- La digestion avec la protéinase K (étape 11 du *manuel du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) doit être effectuée pendant 1 heure.
- Les échantillons doivent être élués dans 200 µl de tampon d'éluion (Buffer ATE) du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

* Ne pas utiliser d'alcool dénaturé contenant d'autres substances telles que du méthanol ou de la butanone.

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

Extraction de l'ADN pour les échantillons de NSCLC

Utiliser le QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, N° de réf. 56404) avec les modifications de protocole indiquées ci-dessous pour la purification de l'ADN génomique d'échantillons préparés à partir de prélèvements FFPE de tissus NSCLC.

Remarque : le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a été validé à l'aide d'ADN extrait au moyen du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Ne pas utiliser d'autre produit d'extraction de l'ADN.

Procéder à l'extraction de l'ADN conformément aux instructions du *manuel du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* en tenant compte des éléments suivants :

- Ne pas effectuer l'étape de RNase décrite dans le *manuel du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Ne pas utiliser la Deparaffinization Solution QIAGEN fournie dans le QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Pour le déparaffinage, utiliser uniquement la méthode au xylène ou à l'éthanol décrite dans le *manuel du kit QIAamp DNA FFPE Tissue*.
- Utiliser de l'éthanol de qualité biologie moléculaire pour toutes les étapes requises.*
- Utiliser 2 sections de 5 µm par extraction.
- Le QIAamp DNA FFPE Tissue Kit doit être utilisé uniquement de façon manuelle.
- Ne pas effectuer l'étape de RNase décrite dans le manuel du *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Ne pas utiliser la Deparaffinization Solution QIAGEN du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Pour le déparaffinage, utiliser uniquement la méthode au xylène ou à l'éthanol décrite dans le *manuel du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.

* Ne pas utiliser d'alcool dénaturé contenant d'autres substances telles que du méthanol ou de la butanone.

-
- La digestion avec la protéinase K (étape 11 du *manuel du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) doit être effectuée pendant 1 heure.
 - Ajouter 60 µl de tampon d'éluion (ATE) du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit et incubé pendant 2,5 minutes à température ambiante.
 - Centrifuger à pleine vitesse pendant 1 minute.
 - Ajouter de nouveau 60 µl de tampon d'éluion (ATE) du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit et incubé pendant 2,5 minutes à température ambiante.
 - Centrifuger à pleine vitesse pendant 1 minute.

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

Protocole : évaluation des échantillons d'ADN

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

Remarque : pour l'évaluation manuelle des échantillons, voir Annexe 1: protocole manuel du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Points importants avant de commencer

Remarque : L'évaluation des échantillons d'ADN n'est pas conçue pour détecter la présence d'inhibiteurs de PCR, car seul l'ADN amplifiable total dans un échantillon est évalué au moyen de la réaction de contrôle.

Remarque : il est important d'utiliser le mélange réactionnel de contrôle comme décrit ci-dessous pour cette évaluation et non la spectrophotométrie ou toute autre méthode. Il est possible que l'ADN fortement dégradé ne s'amplifie pas, même si les amorces génèrent de courts fragments d'ADN.

- Le mélange réactionnel de contrôle (tube CTRL) disponible permet d'évaluer un maximum de 24 échantillons.
- Utiliser le CTRL pour évaluer l'ADN avant le test avec le dosage d'évaluation des mutations.
- Pour une utilisation efficace des réactifs du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, regrouper autant que possible les échantillons d'ADN par lots pour obtenir des cycles complets. Le fait de tester les échantillons individuellement ou en petits nombres consomme plus de réactifs et réduit la quantité totale d'échantillons pouvant être testés avec un seul *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- Ne pas faire passer la *Taq* ADN polymérase (Tube *Taq*) ou tout autre mélange contenant de la *Taq* ADN polymérase dans l'agitateur au risque de désactiver l'enzyme.
- Pipeter la *Taq* ADN polymérase en plaçant avec précaution la pointe de la pipette juste sous la surface du liquide pour éviter le risque d'enrobage de la pointe dans l'excès d'enzyme.

-
- Afin de minimiser les indicateurs pour les contrôles, un strict respect des instructions données dans le *mode d'emploi du theascreen KRAS RGQ PCR Kit* est requis en ce qui concerne le bon mélange des réactifs et doit être assuré à chaque étape de mélange pendant la configuration du dosage.

Étapes préliminaires

- Vérifier que le Rotor-Gene Q *theascreen* KRAS Assay Package correspondant à la version du logiciel Rotor-Gene est installé avant la première utilisation de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (voir Annexe 2 : installation du *theascreen* KRAS Assay Package).
- Avant chaque utilisation, tous les réactifs doivent être mis à décongeler complètement durant au moins une heure à température ambiante (15-25 °C), mélangés en les retournant 10 fois et passés brièvement à la centrifugeuse pour prélever le contenu au fond du tube. Un mélange correct des réactifs doit être assuré pendant la configuration du dosage.
- S'assurer que la *Taq* ADN polymérase (tube *Taq*) est à température ambiante (15-25 °C) avant chaque utilisation. Centrifuger brièvement le tube afin que toute l'enzyme soit rassemblée au fond du tube.

Procédure

1. Décongeler complètement le mélange réactionnel de contrôle (tube CTRL), l'eau exempte de nucléase pour NTC et le contrôle positif KRAS (Positive Control, PC) à température ambiante (15-25°C) pendant au moins une heure.

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

* 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 : la configuration de la PCR doit s'effectuer à température ambiante.

2. Mélanger les réactifs décongelés en retournant chaque tube 10 fois pour éviter les concentrations locales de sels, puis les centrifuger brièvement afin que leur contenu soit rassemblé au fond des tubes.

Remarque : ne pas faire passer dans l'agitateur la *Taq* ADN polymérase (*Taq*) ou tout mélange contenant de la *Taq*, car cela risquerait de désactiver cette enzyme.

Remarque : Un mélange correct des réactifs doit être assuré pendant la configuration du dosage.

3. Préparer suffisamment de mélanges principaux (mélange réactionnel de contrôle [CTRL] plus *Taq* ADN polymérase [Taq]) en respectant les volumes indiqués dans le tableau 3 pour :
 - Tous les échantillons d'ADN
 - 1 réaction de contrôle positif KRAS (Positive Control, PC)
 - 1 eau exempte de nucléase pour NTC
 - 1 échantillon supplémentaire afin de disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR.

Le mélange principal du dosage de contrôle contient tous les composants nécessaires pour la PCR, à l'exception de l'échantillon.

Tableau 3. Préparation du mélange principal du dosage de contrôle

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

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

Préparer suffisamment de mélange principal pour 1 échantillon supplémentaire (n + 1) afin de disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR. La valeur de n ne doit pas dépasser 24 (plus les contrôles), 24 étant le nombre maximum d'échantillons pour une analyse.

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

Remarque : Pipeter la *Taq* ADN polymérase en plaçant avec précaution la pointe de la pipette juste sous la surface du liquide pour éviter le risque d'enrobage de la pointe dans l'excès d'enzyme.

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

Remarque : laisser les capuchons dans le récipient en plastique pendant le temps nécessaire.

Tableau 4. Répartition des tubes du cycle dans le bloc de chargement pour l'évaluation des échantillons d'ADN

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

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

5. Régler une pipette sur un volume inférieur au volume total du mélange principal et homogénéiser soigneusement 10 fois par aspiration-refoulement.

Remarque : Un mélange correct des réactifs doit être assuré pendant la configuration du dosage.

6. Ajouter immédiatement 20 µl de mélange principal dans chaque tube de PCR en barrette.

Remarque : voir le tableau 4 pour la répartition des tubes. Pour l'évaluation des échantillons d'ADN, le mélange principal du dosage de contrôle doit être ajouté à un tube PC, un tube NTC et un tube pour chaque échantillon d'ADN.

7. Ajouter immédiatement 5 µl d'eau exempte de nucléase pour NTC au tube NTC (le tube en position 2) et fermer le tube.

8. Ajouter 5 µl de chaque échantillon d'ADN dans les tubes d'échantillons (les tubes en positions 3 à 26) et fermer les tubes.

9. Ajouter 5 µl de contrôle positif KRAS (Positive Control, PC) au tube PC (le tube en position 1) et fermer le tube.

Remarque : Chaque tube doit contenir un volume réactionnel total de 25 µl (20 µl de mélange principal préparé conformément au tableau 3, plus 5 µl de NTC/échantillon/PC).

10. À l'aide d'un marqueur permanent, marquer le couvercle des premiers tubes se trouvant aux positions numériques inférieures de chaque barrette de 4 tubes de PCR (p. ex. positions 1, 5, 9, etc.) pour indiquer l'orientation du chargement des tubes dans le rotor à 72 puits de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
11. Retourner 4 fois les tubes fermés pour homogénéiser l'échantillon et le mélange réactionnel.
Remarque : Un mélange correct des réactifs doit être assuré pendant la configuration du dosage.
12. Placer toutes les barrettes de 4 tubes de PCR dans les positions appropriées du rotor à 72 puits conformément à la répartition des tubes du cycle indiquée dans le tableau 4 en les orientant à l'aide des marques.
Remarque : si le rotor n'est pas complètement rempli, mettre des tubes vides fermés dans toutes les positions vacantes. Cela permet de maintenir l'efficacité thermique de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
13. Placer le rotor à 72 puits dans l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Vérifier que la bague de verrouillage (fournie avec 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.
14. Double-cliquer sur l'icône « *therascreen KRAS QC Locked Template* » (Modèle verrouillé du *therascreen KRAS QC*) sur le bureau de l'ordinateur connecté à l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (figure 1) pour lancer le logiciel Rotor-Gene Q.

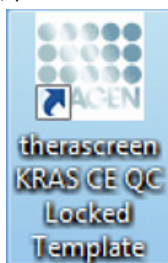


Figure 1. Icône « *therascreen KRAS QC Locked Template* » (Modèle verrouillé du *therascreen KRAS QC*).

L'onglet Setup (Configuration) s'affiche par défaut (figure 2).

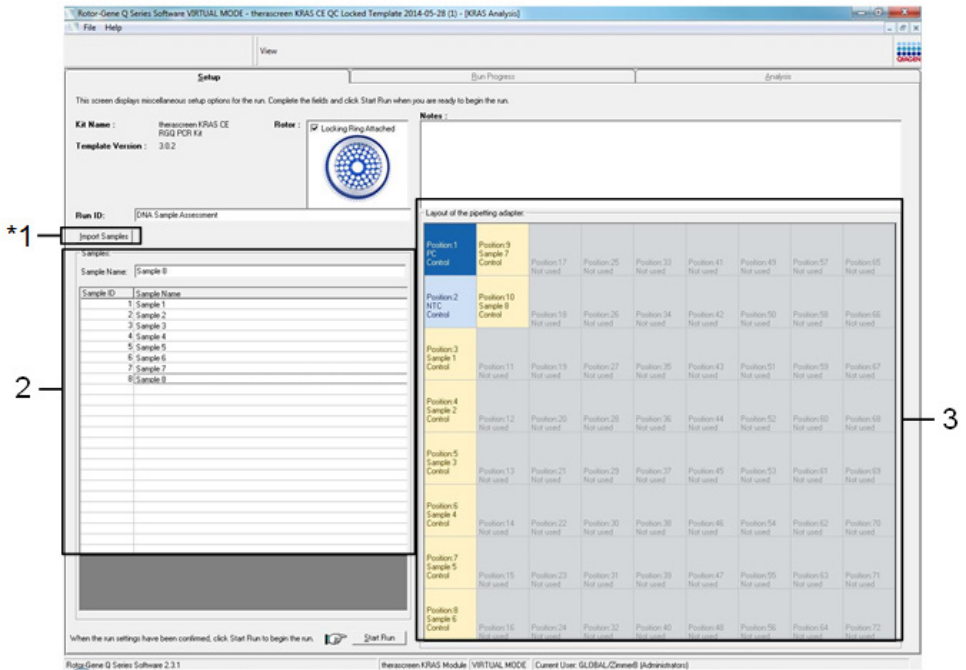


Figure 2. Onglet « Setup » (Configuration) et case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage fixée).

1 = onglet « Setup » (Configuration), 2 = case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage fixée).

15. 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.
16. 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 des 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).

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 3).

Remarque : il est possible que les noms d'échantillons comportant plus de 8 caractères ne s'affichent pas entièrement dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipette).

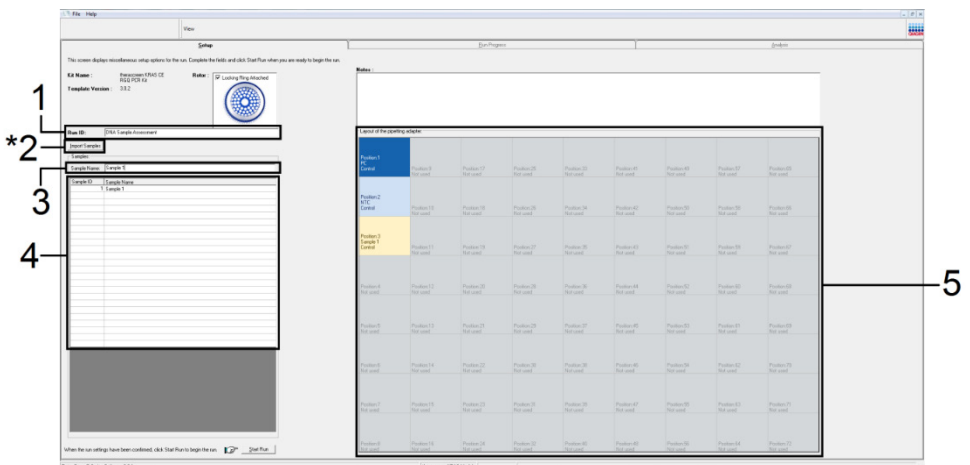


Figure 3. Saisie du « Run ID » (ID de cycle) et du « Sample Name » (Nom d'échantillon). 1 = champ « Run ID » (ID de cycle), 2 = bouton « Import Samples » (Importer des échantillons), 3 = champ « Sample Name » (Nom d'échantillon), 4 = liste des échantillons, 5 = panneau « Layout of the pipetting adapter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

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

Remarque : pour modifier un nom d'échantillon, cliquer sur Sample Name (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 (Retour) pour réactualiser le nom.

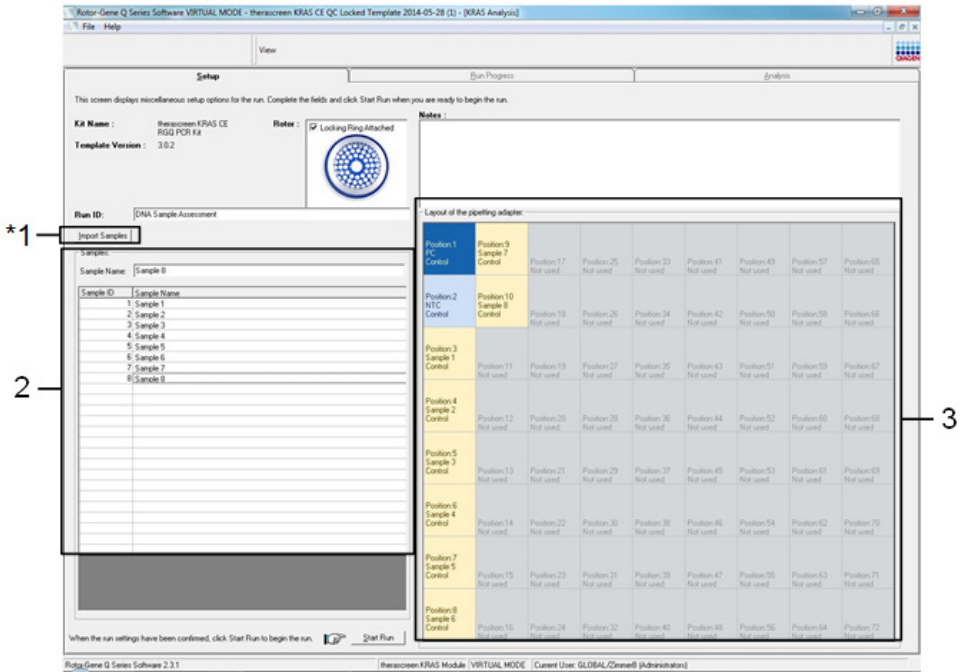


Figure 4. Saisie de nouveaux noms d'échantillons dans le champ Sample Name (Nom d'échantillon). *1 = bouton « Import Sample » (Importer l'échantillon), 2 = champ « Sample Name » (Nom d'échantillon) et liste de échantillons, 3 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipetage) avec noms d'échantillons supplémentaires.

18. 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 message d'avertissement s'affiche (figure 5 et figure 6) pour rappeler à l'utilisateur que toutes les positions vacantes 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.

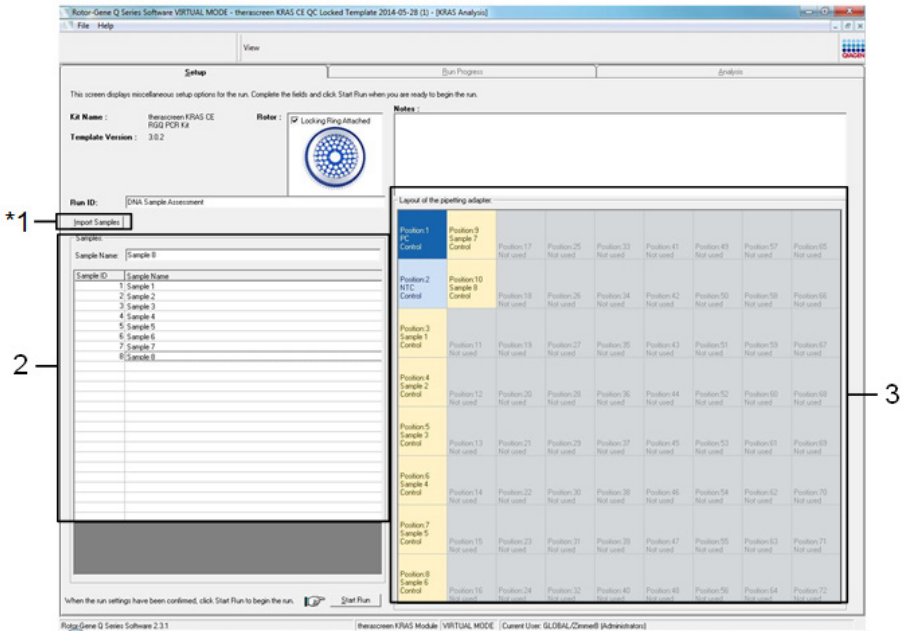


Figure 5. Champ « Notes », bouton « Start Run » (Démarrer le cycle) et « Warning » (Avertissement) concernant les positions de rotor inutilisées.

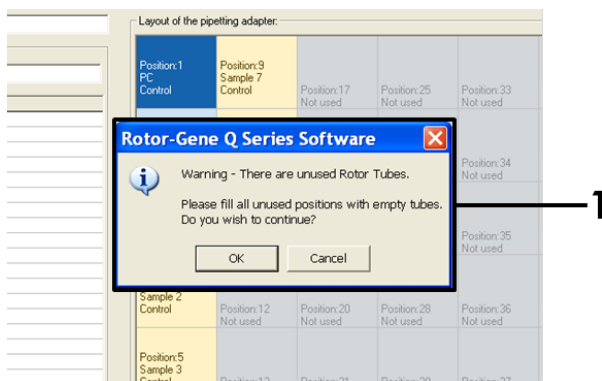


Figure 6. 1 = Avertissement concernant les positions de rotor inutilisées.

19. Une boîte de dialogue Save As (Enregistrer sous) apparaît. 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 7).

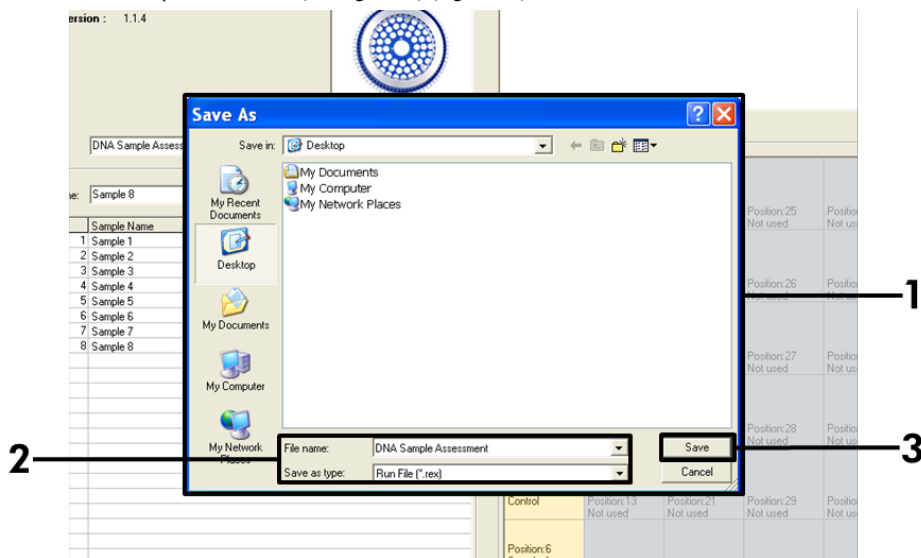


Figure 7. Enregistrement du fichier de cycle. 1 = fenêtre « Save As » (Enregistrer sous), 2 = champs « File name » (Nom de fichier) et « Save as type » (Type de fichier) *. rex, 3 = bouton « Save » (Enregistrer).

Le cycle de PCR démarre.

Remarque : lorsque le cycle démarre, l'onglet Run Progress (Progression du cycle) s'ouvre automatiquement pour afficher le suivi de la température et le temps de cycle restant (figure 8).

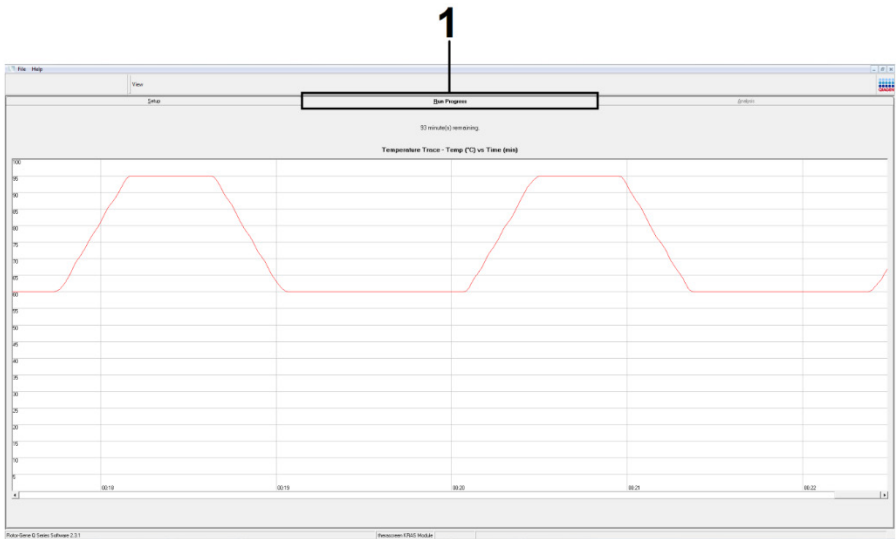


Figure 8. Onglet « Run Progress » (Progression du cycle).

À la fin du cycle, l'onglet Analysis (Analyse) s'ouvre automatiquement.

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

Remarque : la méthode de calcul est expliquée dans la section Interprétation des résultats.

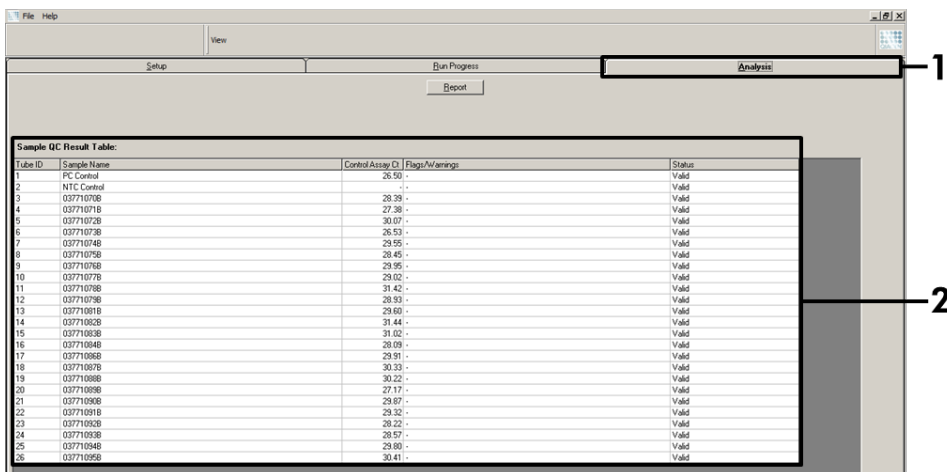


Figure 9. Onglet Analysis (Analyse) et rapport des résultats. 1 = onglet « Analysis » (Analyse), 2 = panneau « Sample QC Result Table » (Tableau des résultats de CQ des échantillons).

Remarque : les résultats des contrôles sont rapportés comme suit dans le panneau Sample QC Result Table (Tableau des résultats de CQ des échantillons) (légende n° 2 dans la figure 9).

- Contrôles de cycle (PC et NTC aux positions de tubes 1 et 2, respectivement) : la mention Valid (Valide) s'affiche si les résultats se trouvent dans les intervalles acceptables. Dans le cas contraire, un résultat Invalid (Non valide) s'affiche.
- Valeur de C_T pour la réaction de contrôle d'échantillon $> 32,00$: la mention Invalid (Non valide) s'affiche. 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 selon la disponibilité (voir section Interprétation (manuelle) des résultats).

Interprétation (manuelle) des résultats

Une fois que le cycle d'évaluation des échantillons ou le cycle d'analyse des mutations est terminé, analyser les données conformément à la procédure suivante.

Paramètres d'analyse du logiciel

1. Ouvrir le fichier approprié à l'aide du logiciel Rotor-Gene Q version 2.3.
2. Si les échantillons n'ont pas été nommés avant le cycle, cliquer sur Edit Samples (Modifier les échantillons).
3. Insérer les noms de vos échantillons dans la colonne « Name » (Nom).
4. Cliquer sur Analysis (Analyse). Sur la page d'analyse, cliquer sur Cycling A. Yellow pour afficher le canal HEX.
5. Cliquer sur Named On (Nommé).
Remarque : cela empêche les puits vides de figurer dans l'analyse.
6. Sélectionner Dynamic tube (Tube dynamique).
7. Sélectionner Linear Scale (Échelle linéaire).
8. Cliquer sur Outlier Removal (Suppression des valeurs aberrantes) et saisir 10% dans le champ NTC Threshold (Seuil du NTC).
9. Attribuer au seuil une valeur de 0.05 (0,05) et vérifier les valeurs de C_T HEX.
10. Sur la page d'analyse, cliquer sur Cycling A. Green pour afficher le canal FAM.
11. Vérifier que Dynamic Tube (Tube dynamique) est mis en surbrillance. Cliquer sur Linear Scale (Échelle linéaire).
12. Cliquer sur Outlier Removal (Suppression des valeurs aberrantes) et saisir 10% dans le champ NTC Threshold (Seuil du NTC).
13. Attribuer au seuil une valeur de 0.05 (0,05) et vérifier les valeurs de C_T FAM.

Analyse des données d'évaluation de l'échantillon

Analyse des contrôles de cycles

Consulter l'organigramme d'analyse des contrôles de cycles dans la figure 42.

- **Negative control (Contrôle négatif)** : pour garantir l'absence de contamination du mélange réactionnel, le NTC ne doit pas générer une valeur de C_T inférieure à 40 sur le canal vert. Pour garantir le bon paramétrage de la plaque, le NTC doit présenter une amplification de 31,91 à 35,16 sur le canal jaune. Les valeurs spécifiées incluent ces valeurs et sont comprises entre elles.
- **Positive control (Contrôle positif)** : le contrôle positif (Positive Control, PC) KRAS doit donner une valeur de C_T comprise entre 23,5 et 29,5 sur le canal vert pour chacun des 8 dosages. Les valeurs spécifiées incluent ces valeurs et sont comprises entre elles. Une valeur en dehors de cet intervalle indique un problème de configuration du dosage et constitue un échec du cycle.

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

Sous réserve que les deux contrôles de cycles soient valides, chaque valeur de C_T d'échantillon doit être comprise dans l'intervalle 21,92–32,00 sur le canal vert. Si l'échantillon se trouve en dehors de cet intervalle, se conformer aux indications suivantes.

Analyse des échantillons : dosage de contrôle

- C_T de dosage de contrôle d'échantillons < 21,92 : les échantillons présentant un C_T de contrôle < 21,92 doivent être dilués, car il s'agit de la limite inférieure validée du dosage. Pour détecter chaque mutation en faible concentration, les échantillons surconcentrés doivent être dilués afin d'être compris dans l'intervalle susmentionné, sachant qu'une dilution de moitié augmente la valeur de C_T de 1. Si l'échantillon est proche de 21,92, il est recommandé d'effectuer la dilution pour garantir l'obtention d'un résultat de cycle de test de l'échantillon (détection de mutations KRAS). Les échantillons doivent être dilués en utilisant l'eau fournie dans le kit (eau exempte de nucléase pour dilution [Dil.]).

- C_T de dosage de contrôle d'échantillons > 32 : il est recommandé de réextraire l'échantillon, car la quantité d'ADN matrice est insuffisante pour détecter toutes les mutations aux valeurs seuils indiquées pour le dosage.

Analyse de la détection des mutations KRAS

Analyse des contrôles de cycles

Consulter l'organigramme d'analyse des contrôles de cycles (figure 10).

- **Negative control (Contrôle négatif)** : pour garantir l'absence de contamination du mélange réactionnel, le NTC ne doit pas générer une valeur de C_T inférieure à 40 sur le canal vert. Pour garantir le bon paramétrage de la plaque, le NTC doit présenter une amplification de 31,91 à 35,16 sur le canal jaune. Les valeurs spécifiées incluent ces valeurs et sont comprises entre elles.
- **Positive control (Contrôle positif)** : le contrôle positif (Positive Control, PC) KRAS doit donner une valeur de C_T comprise entre 23,5 et 29,5 sur le canal vert pour chacun des 8 dosages. Les valeurs spécifiées incluent ces valeurs et sont comprises entre elles. Une valeur en dehors de cet intervalle indique un problème de configuration du dosage et constitue un échec du cycle.
- **Remarque** : les données des échantillons ne doivent pas être utilisées en cas d'échec de l'un de ces deux contrôles de cycles.

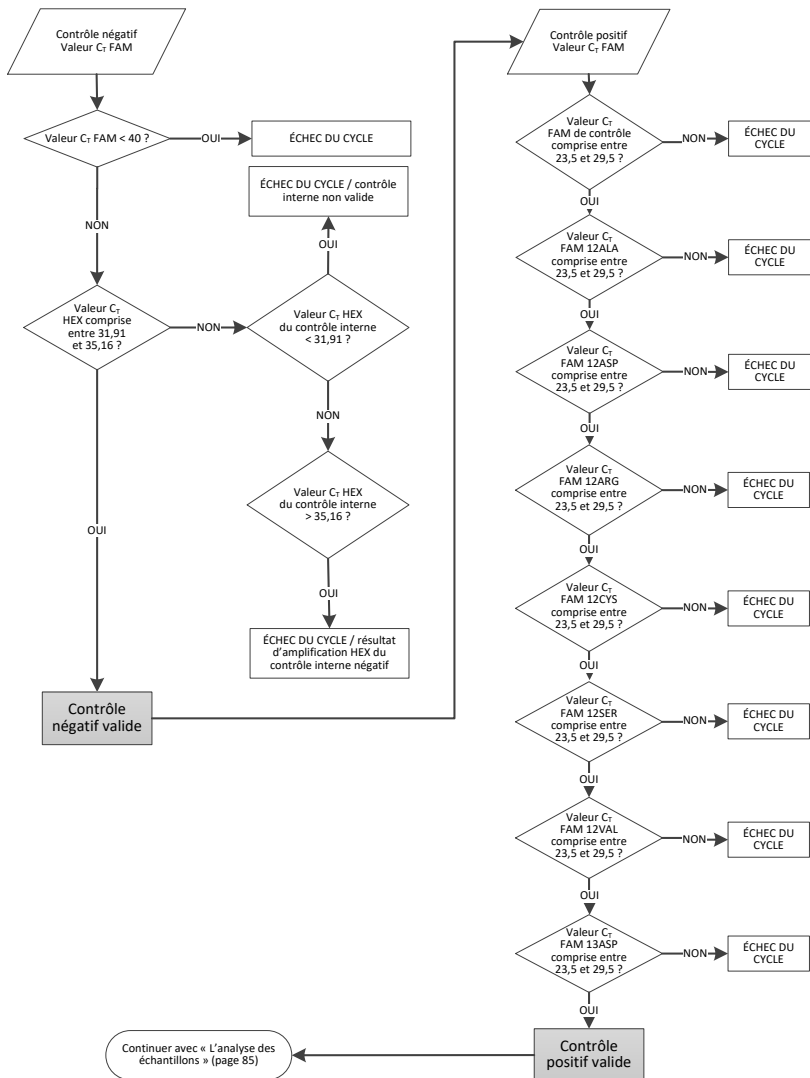


Figure 10. Organigramme d'analyse des contrôles de cycles.

Analyse des échantillons

Consulter l'organigramme de la figure 11 relatif à l'analyse des échantillons.

Valeur de C_T FAM du contrôle d'échantillon

Sous réserve que les deux contrôles de cycles soient valides pour le dosage de contrôle, chaque valeur de C_T de contrôle d'échantillon doit être comprise dans l'intervalle 21,92–32,00 sur le canal vert.

Si l'échantillon se trouve en dehors de cet intervalle, se conformer aux indications suivantes.

- C_T de dosage de contrôle d'échantillon $< 21,92$: les échantillons avec une valeur de C_T de contrôle $< 21,92$ surchargent les dosages de mutations et doivent être dilués. Pour détecter chaque mutation en faible concentration, les échantillons surconcentrés doivent être dilués afin d'être compris dans l'intervalle susmentionné, sachant qu'une dilution de moitié augmente la valeur de C_T de 1. Les échantillons doivent être dilués en utilisant l'eau fournie dans le kit (eau exempte de nucléase pour dilution [Dil.]).
- C_T de dosage de contrôle d'échantillon > 32 : interpréter ces résultats avec précaution, car il est possible que des mutations en très faible concentration ne soient pas détectées.

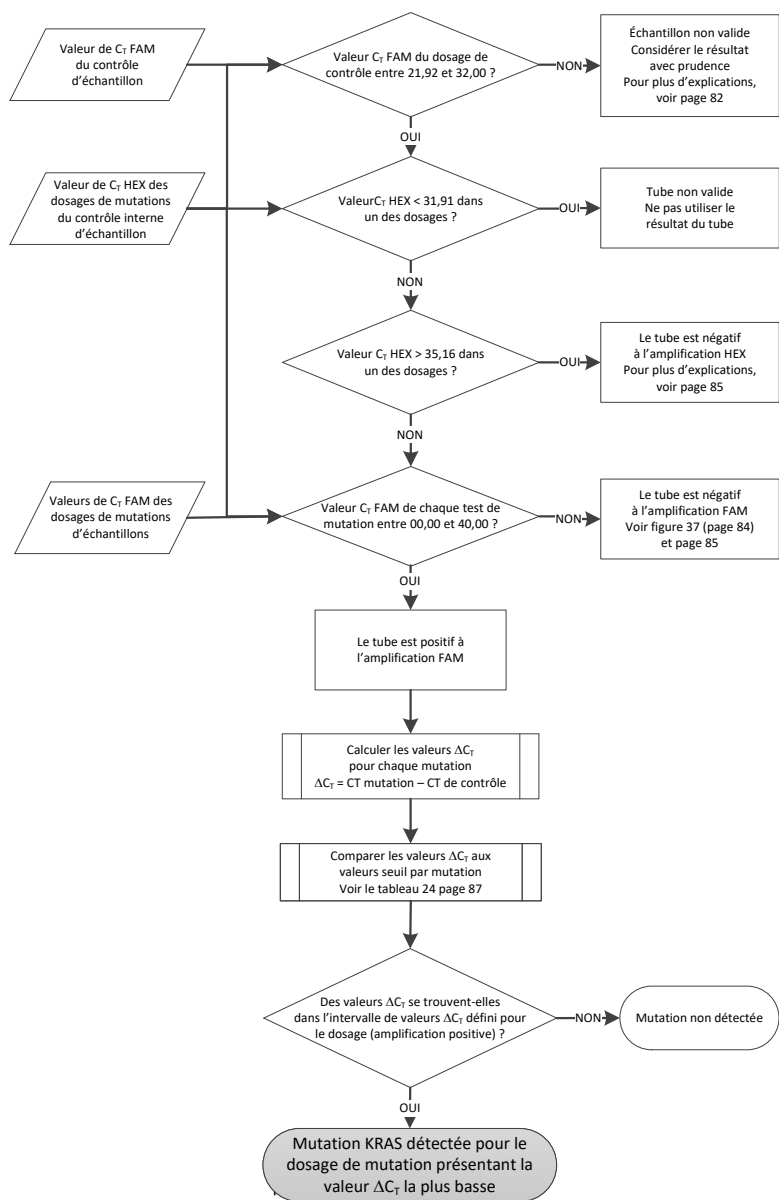


Figure 11. Organigramme d'analyse des échantillons.

Valeur de C_T HEX des dosages de mutations du contrôle interne d'échantillon

Consulter l'organigramme de la figure 11 relatif à l'analyse des échantillons.

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

- Si le C_T du contrôle interne se trouve dans l'intervalle spécifié (31,91–35,16), le résultat d'amplification HEX est positif.
- Si le C_T du contrôle interne est au-delà de l'intervalle spécifié (> 35,16), le résultat d'amplification HEX est négatif.
- Si le C_T du contrôle interne est en deçà de l'intervalle spécifié (< 31,91), le résultat est non valide.
- En cas d'échec du contrôle interne dû à l'inhibition de la PCR, la dilution de l'échantillon peut réduire l'effet des inhibiteurs, mais il faut prendre en compte que cela entraîne aussi la dilution de l'ADN cible. Un tube d'eau pour dilution d'échantillons (Dil.) est fourni avec le kit.

Valeurs de C_T FAM des dosages de mutations d'échantillons

Les valeurs de FAM pour les 7 mélanges réactionnels de mutation doivent être vérifiées par rapport aux valeurs indiquées dans le tableau 5.

Tableau 5. Valeurs de réactions de mutations d'échantillons acceptables (FAM)*

Dosage	Intervalle de valeurs de C_T acceptables	Δ Intervalle de C_T
12ALA	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12ASP	0,00-40,00	$\leq 6,60$
12ARG	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12CYS	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12SER	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12VAL	0,00-40,00	$\leq 7,50$
13ASP	0,00-40,00	$\leq 7,50$

* Les valeurs acceptables incluent ces valeurs et sont comprises entre elles.

- Si la valeur de CT FAM se trouve dans l'intervalle spécifié, le résultat d'amplification FAM est positif.
- Si la valeur de CT FAM dépasse l'intervalle spécifié ou s'il n'y a aucune amplification, le résultat d'amplification FAM est négatif.
- Calculer la valeur de DCT pour chaque tube de détection de mutations avec un résultat d'amplification FAM positif comme suit, en veillant à ce que les valeurs de CT du contrôle et des mutations proviennent du même échantillon.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutation} - C_T \text{ de contrôle}$$

Comparer la valeur de ΔC_T de l'échantillon avec le point seuil du dosage en question (tableau 22) en s'assurant que le bon point seuil correct est appliqué à chaque dosage.

Le point seuil est le point au-dessus duquel un signal positif 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, elle est classée comme négative ou hors des limites de détection du kit.

Pour chaque échantillon, un état « mutation détectée », « mutation non détectée » ou « mutation non valide » sera attribué à chaque réaction de mutation à l'aide des critères suivants :

Mutation détectée :

- Résultat d'amplification FAM positif et valeurs de DCT inférieures ou égales au point seuil. Si plusieurs mutations sont détectées, la mutation rapportée doit être celle présentant la valeur de DCT la plus faible.

Mutation non détectée :

- Résultat d'amplification FAM positif et valeurs de DCT supérieures au point seuil.
- L'amplification FAM est négative et l'amplification HEX (contrôle interne) est positive.

Non valide :

- HEX (contrôle interne) non valide.
- Résultats d'amplification FAM et d'amplification HEX négatifs.

Si un échantillon possède un résultat d'amplification HEX négatif dans un tube et un résultat d'amplification FAM positif dans un autre tube, alors un résultat mutation détectée peut toujours être considéré comme valide dans cet autre tube, mais il se peut que la mutation particulière identifiée ne soit pas attribuée de façon fiable.

- Si un échantillon présente un résultat d'amplification HEX négatif et un résultat d'amplification FAM positif dans le même tube, alors le résultat mutation détectée doit être considéré comme valide.
- Si un tube n'est pas valide pour l'amplification HEX (contrôle interne), le résultat de ce tube ne doit pas être utilisé.

Attribution du statut mutationnel des échantillons

Une fois tous les tubes de réactions de mutations évalués, le statut mutationnel des échantillons est déterminé de la manière suivante.

- Mutation détectée : au moins une des 7 réactions de mutations donne un résultat positif. Si plusieurs mutations sont détectées, la mutation rapportée doit être celle présentant la valeur de DCT la plus faible.
- Mutation non détectée : les 7 réactions de mutations donnent un résultat négatif.
- Non valide : aucune réaction de mutation ne donne de résultat positif et au moins une réaction de mutation n'est pas valide.

Remarque : le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est conçu pour détecter les mutations du gène KRAS dans un échantillon d'ADN. Lorsque des mutations KRAS sont détectées pour un échantillon, une seule mutation spécifique doit être rapportée. Si plusieurs mutations sont détectées, la mutation rapportée doit être celle présentant la valeur de ΔC_T la plus faible.

Des réactivités croisées peuvent survenir entre des réactions de mutations. Par exemple, si une concentration élevée en mutation 12ALA est observée, certaines des autres réactions de mutations peuvent aussi donner un résultat positif. Cela est dû au fait que les amorces ARMS détectent les autres mutations de séquence similaire. Si le second dosage de mutation donne un résultat positif, il est probable qu'il s'agit de réactivité croisée. Bien que rares, des doubles mutants ont déjà été observés.

Si une ou plusieurs réactions de mutations ne sont pas valides, mais qu'au moins une mutation donne un résultat positif, l'échantillon peut tout de même être désigné comme « mutation KRAS détectée » puisqu'une mutation est bien présente. Toutefois, il se peut que la mutation spécifique rapportée ne soit pas correcte et qu'elle soit le résultat de la réactivité croisée. Par conséquent, l'échantillon doit uniquement être désigné comme « mutation KRAS détectée ».

- Valeur de C_T pour la réaction de contrôle d'échantillon $< 21,92$: la mention Invalid (Non valide) s'affiche. 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 21,92 et 32,00. Une dilution 1:1 augmente la valeur de C_T de 1,0 environ.
- Valeur de C_T pour la réaction de contrôle d'échantillon comprise entre 21,92 et 32,00 ($21,92 \leq C_T$ du contrôle $\leq 32,00$) : la mention Valid (Valide) s'affiche. 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.

14. Pour générer des fichiers de rapports, cliquer sur Report (Rapport). La fenêtre Report Browser (Explorateur de rapports) s'affiche. Sélectionner KRAS Analysis Report (Rapport d'analyse de KRAS) sous Templates (Modèles), puis cliquer sur Show (Afficher) (figure 12).

Remarque : les rapports peuvent être enregistrés à un autre emplacement au format archives Web en cliquant sur le bouton Save As (Enregistrer sous) dans le coin supérieur gauche de chaque rapport.

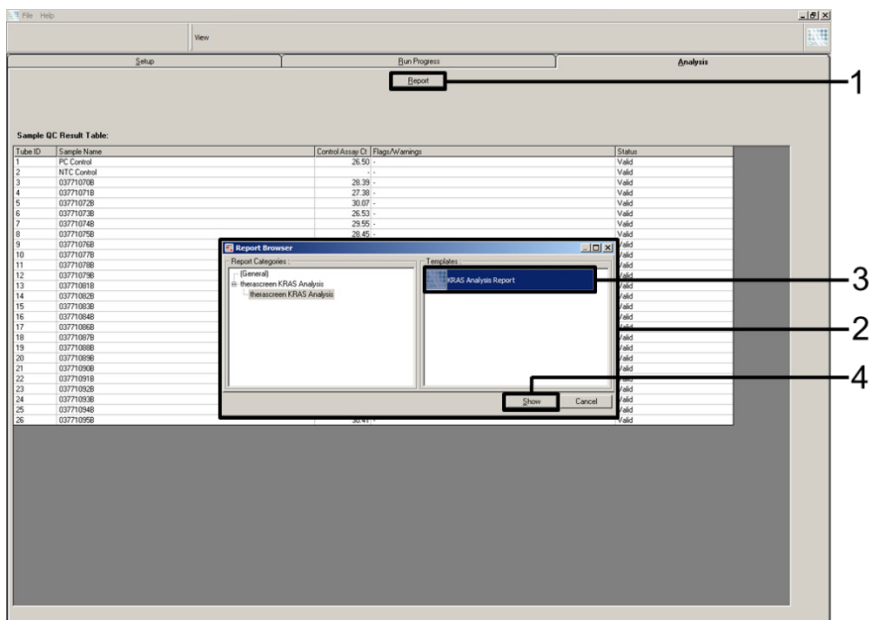


Figure 12. Sélection du modèle KRAS Analysis Report (Rapport d'analyse de KRAS). 1 = « Report » (Rapport), 2 = fenêtre « Report Browser » (Explorateur de rapports), 3 = sélection du modèle « KRAS Analysis Report » (Rapport d'analyse de KRAS), 4 = « Show » (Afficher).

Protocole : détection des mutations KRAS

Ce protocole est utilisé pour la détection des mutations KRAS.

Points importants avant de commencer

- Si l'évaluation de l'échantillon est favorable, ce dernier peut être testé à l'aide des dosages de mutations KRAS.
- Pour une utilisation efficace du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, les échantillons doivent être regroupés en lots de 7 (afin de remplir le rotor de 72 puits). L'utilisation de lots plus petits entraîne une réduction du nombre d'échantillons pouvant être testés avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

- L'échantillon doit être testé à l'aide de tous les mélanges réactionnels fournis dans le *therascreen KRAS RGQ PCR Kit*.
- Ne pas faire passer la *Taq* ADN polymérase (Tube *Taq*) ou tout autre mélange contenant de la *Taq* ADN polymérase dans l'agitateur au risque de désactiver l'enzyme.
- Pipeter la *Taq* ADN polymérase en plaçant avec précaution la pointe de la pipette juste sous la surface du liquide pour éviter le risque d'enrobage de la pointe dans l'excès d'enzyme.
- Afin de minimiser les indicateurs pour les contrôles et les échantillons, un strict respect des instructions données dans le *mode d'emploi du therascreen KRAS RGQ PCR Kit* est requis en ce qui concerne le bon mélange des réactifs et doit être assuré à chaque étape de mélange pendant la configuration du dosage.
- Vérifier que le *therascreen KRAS Assay Package* correspondant à la version du logiciel Rotor-Gene Q est installé avant la première utilisation de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Étapes préliminaires

- Avant chaque utilisation, tous les réactifs doivent être mis à décongeler complètement durant au moins une heure à température ambiante (15-25 °C), mélangés en les retournant 10 fois et passés brièvement à la centrifugeuse pour prélever le contenu au fond du tube.
- S'assurer que la *Taq* ADN polymérase (tube *Taq*) est à température ambiante (15-25 °C) avant chaque utilisation. Centrifuger brièvement le tube afin que toute l'enzyme soit rassemblée au fond du tube. Un mélange correct des réactifs doit être assuré pendant la configuration du dosage.

Procédure

1. Décongeler complètement tous les tubes du mélange réactionnel, l'eau sans nucléase pour le tube de contrôle sans matrice (NTC) et le contrôle positif (Tube PC) KRAS à température ambiante (15-25 °C) pendant au moins une heure.

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

Tableau 6. Durée de décongélation des réactifs

Durée de décongélation			
Minimum	Maximum	Température de stockage après préparation de la PCR	Durée maximale de préparation et de stockage de la PCR
1 heure	4,5 heures	Température ambiante (15-25°C)	7 heures
1 heure	4,5 heures	2-8°C	18 heures

Remarque : la configuration de la PCR doit s'effectuer à température ambiante. Le terme « stockage » désigne la durée entre l'achèvement de la préparation de la PCR et le début de l'analyse par PCR sur l'appareil Rotor-Gene Q MDx.

Remarque : amener la *Taq* ADN polymérase (tube *Taq*) à température ambiante (15-25 °C) en même temps que les autres réactifs (voir 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 directement afin de prélever le contenu au fond du tube.

Remarque : Un mélange correct des réactifs doit être assuré pendant la configuration du dosage.

3. Marquer 8 tubes de microcentrifugeuse (non fournis) conformément aux mélanges réactionnels indiqués dans le tableau ci-après. Préparer suffisamment de mélange principal (mélange réactionnel du contrôle ou des mutations [tube CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL ou 13ASP] plus *Taq* ADN polymérase [*Taq*]) pour les échantillons d'ADN, un tube de contrôle positif KRAS (tube PC) et un tube d'eau exempte de nucléase pour NTC (tube NTC) conformément aux volumes indiqués dans le tableau. Inclure des réactifs pour 1 échantillon supplémentaire afin de disposer d'une réserve suffisante pour la préparation de la PCR.

Remarque : Les mélanges principaux contiennent tous les composants nécessaires pour la PCR à l'exception de l'échantillon.

Tableau 7. Mélange principal et volume correspondant

Dosage et tube de mélange réactionnel	Volume de mélange réactionnel	Volume de Taq ADN polymérase
Contrôle (tube CTRL)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12ALA (tube 12ALA)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12ASP (tube 12ASP)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12ARG (tube 12ARG)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12CYS (tube 12CYS)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12SER (tube 12SER)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12VAL (tube 12VAL)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
13ASP (tube 13ASP)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$

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

Préparer suffisamment de mélange principal 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 7 (plus les contrôles), 7 étant le nombre maximum d'échantillons pour une analyse..

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

- Placer le nombre approprié de barrettes de 4 tubes de PCR (chaque barrette contient 4 tubes) dans le bloc de chargement comme indiqué dans le tableau 4. Répartition des tubes du cycle dans le bloc de chargement pour l'évaluation des échantillons d'ADN. Les chiffres indiquent les positions dans le bloc de chargement et la position finale dans le rotor. Ne pas fermer les tubes.

Remarque : laisser les capuchons dans le récipient en plastique pendant le temps nécessaire.

- Régler une pipette sur un volume inférieur au volume total du mélange réactionnel et homogénéiser les mélanges principaux soigneusement 10 fois par aspiration-refoulement.

Remarque : Un mélange correct des réactifs doit être assuré pendant la configuration du dosage.

Pour la détection des mutations KRAS, les mélanges principaux des dosages doivent être ajoutés à 8 tubes PC, 8 tubes NTC et 8 tubes pour chaque échantillon d'ADN.

- Ajouter immédiatement 20 µl de mélange principal dans chaque tube de PCR en barrette correspondant.

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

Tableau 8. Répartition des tubes du cycle dans le bloc de chargement pour la détection des mutations KRAS

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

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

- Ajouter immédiatement 5 µl d'eau exempte de nucléase pour NTC aux tubes NTC (les tubes en positions 9 à 16) et fermer les tubes.
- Ajouter 5 µl de chaque échantillon d'ADN dans les tubes d'échantillons (les tubes en positions 17 à 72) et fermer les tubes.

9. Ajouter 5 µl de contrôle positif KRAS (Positive Control, PC) aux tubes PC (les tubes en positions 1 à 8) et fermer les tubes.
10. À l'aide d'un marqueur permanent, marquer le couvercle des premiers tubes se trouvant aux positions numériques inférieures de chaque barrette de 4 tubes de PCR (p. ex. positions 1, 5, 9, etc.) pour indiquer l'orientation du chargement des tubes dans le rotor à 72 puits de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
11. Retourner 4 fois les tubes fermés pour homogénéiser l'échantillon et le mélange réactionnel.
Remarque : Un mélange correct des réactifs doit être assuré pendant la configuration du dosage.
12. Placer toutes les barrettes de 4 tubes de PCR dans les positions appropriées du rotor à 72 puits conformément à la répartition des tubes du cycle indiquée dans le tableau 8 en les orientant à l'aide des marques.
Remarque : 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. Cela permet de maintenir l'efficacité thermique de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
13. Placer le rotor à 72 puits dans l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Vérifier que la bague de verrouillage (fournie avec 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.
14. Double-cliquer sur l'icône « *therascreen* KRAS Locked Template » (Modèle verrouillé du *therascreen* KRAS) sur le bureau de l'ordinateur connecté à l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (figure 13) pour lancer le logiciel du Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

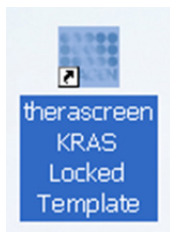


Figure 13. Icône *therascreen* KRAS Locked Template (Modèle verrouillé du *therascreen* KRAS).

L'onglet Setup (Configuration) s'affiche par défaut (figure 14).

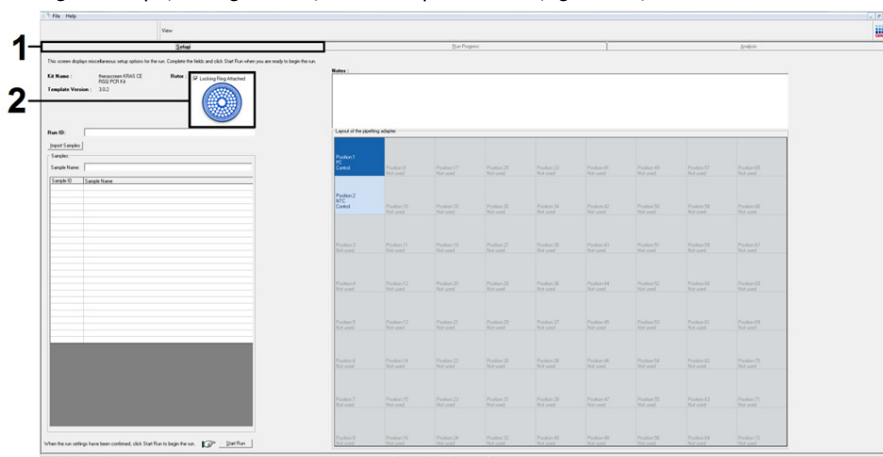


Figure 14. 1 = onglet « Setup » (Configuration) et 2 = case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage fixée).

15. 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.
16. Saisir l'identifiant du cycle dans le champ Run ID (ID de cycle) conformément aux pratiques de votre laboratoire.
17. 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 des 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 15).

Remarque : dans le panneau « Layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipetage), vérifiez que l'ajout du nom de l'échantillon est mis en évidence par un changement de couleur et que les 8 dosages dans la colonne sous le cercle de l'échantillon sont en surbrillance (figure 15).

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 : il est possible que les noms d'échantillons comportant plus de 8 caractères ne s'affichent pas entièrement dans le panneau Layout of the pipetting adapter (Agencement de l'adaptateur de pipette).

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.

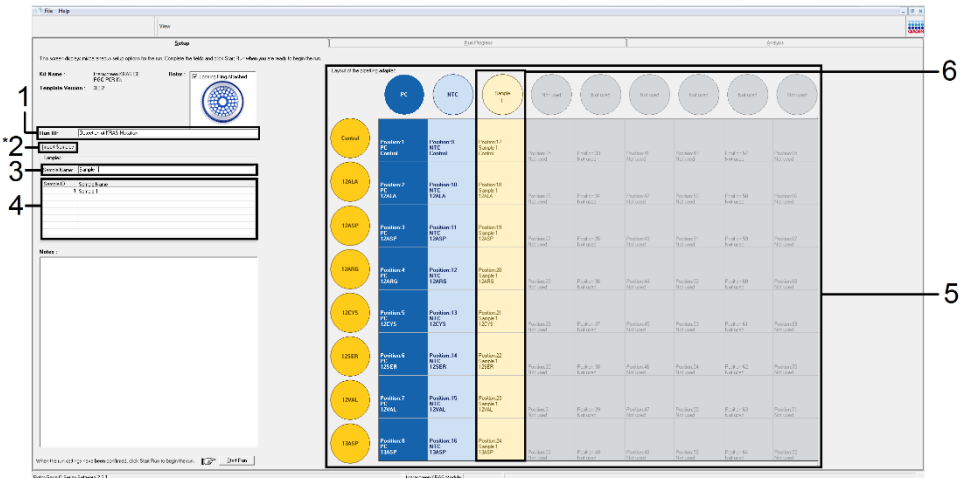


Figure 15. Saisie du « Run ID » (ID de cycle) et du « Sample Name » (Nom d'échantillon). 1 = champ « Run ID » (ID de cycle), 2 = « Import Sample » (Importer l'échantillon) (fonctionnalité non disponible dans la version 2.1), 3 = champ « Sample Name » (Nom d'échantillon), 4 = liste des échantillons, 5 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipette), 6 = cercle d'échantillon en surbrillance et colonne de 8 dosages en dessous.

18. Répéter l'étape 14 pour saisir les noms de tous les échantillons supplémentaires (figure 16).

Remarque : pour modifier un nom d'échantillon, cliquer sur le 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 (Retour) pour réactualiser le nom.

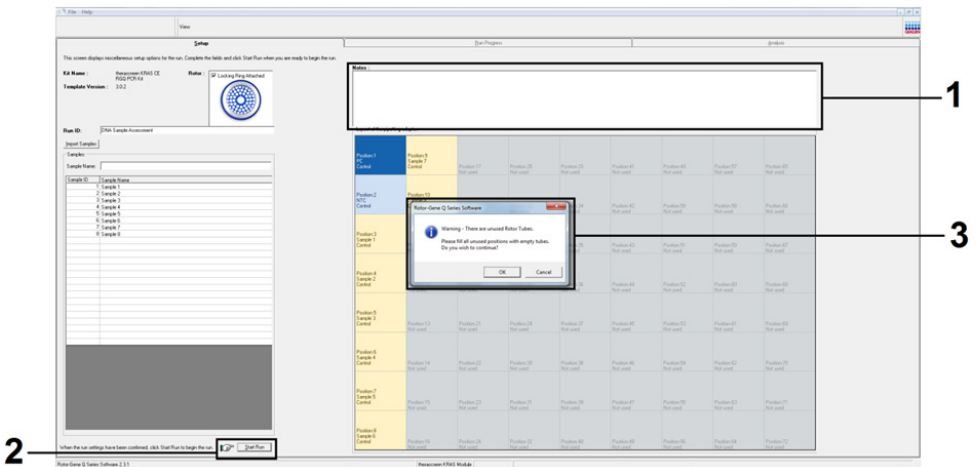


Figure 16. Saisie de nouveaux noms d'échantillons dans le champ Sample Name (Nom d'échantillon). 1 = champ « Sample Name » (Nom d'échantillon), 2 = liste des échantillons, 3 = panneau « Layout of the pipetting adapter » (Agencement de l'adaptateur de pipetage) avec les noms d'échantillons supplémentaires.

19. 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 17).

Remarque : si une position de rotor est inutilisée, un message d'avertissement s'affiche (figure 17 et figure 18) pour rappeler à l'utilisateur que toutes les positions vacantes 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.

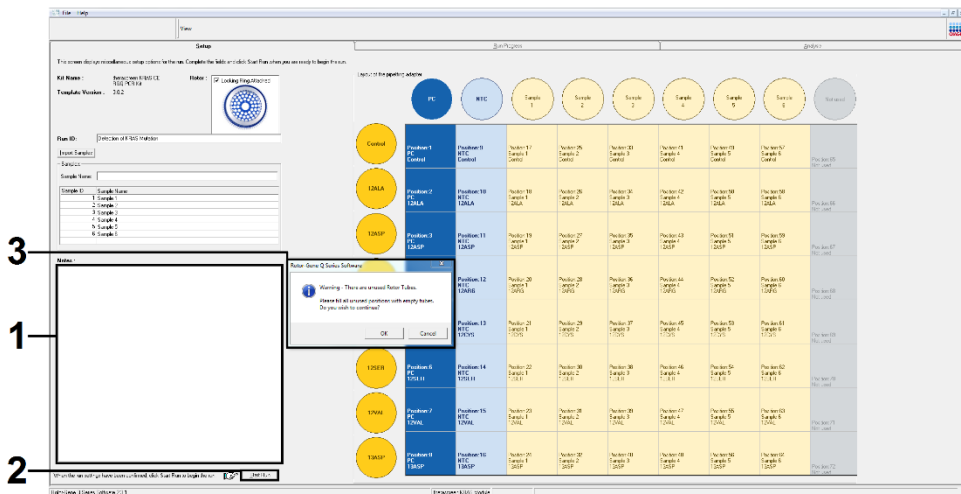


Figure 17. 1 = champ « Notes », 2 = « Start Run » (Démarrer le cycle) et 3 = « Warning » (Avertissement) concernant les positions de rotor inutilisées.

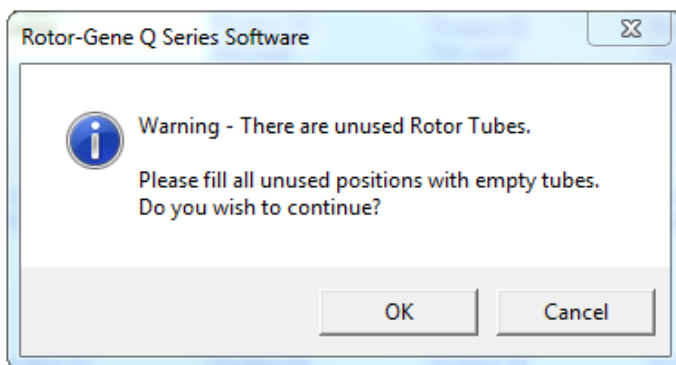


Figure 18. « Warning » (Avertissement) concernant les positions de rotor inutilisées.

20. Dans la fenêtre « Save As » (Enregistrer sous), choisir un nom de fichier approprié et enregistrer le cycle de PCR dans un fichier de cycle *. rex à l'emplacement sélectionné (figure 19).

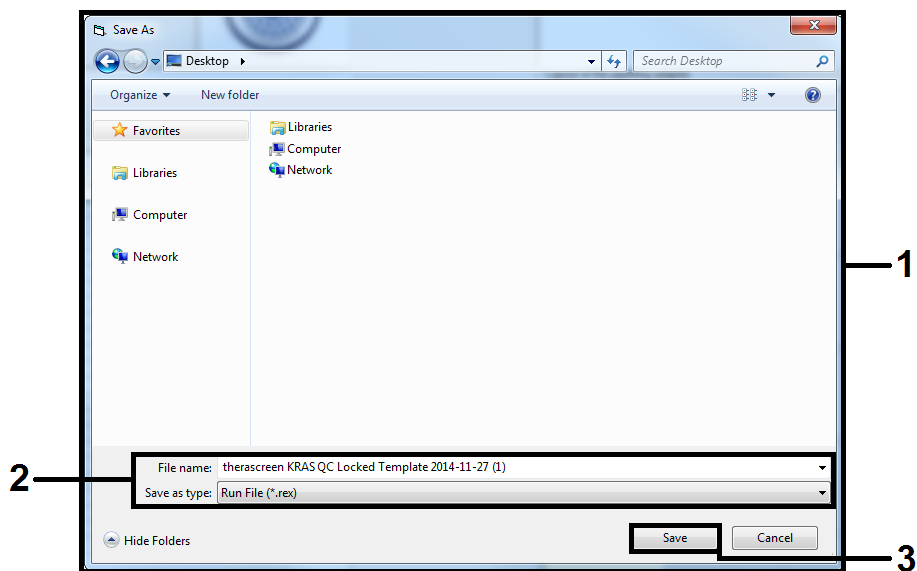


Figure 19. Enregistrement du fichier de cycle.

Le cycle de PCR démarre.

Remarque : lorsque le cycle démarre, l'onglet Run Progress (Progression du cycle) s'ouvre automatiquement pour afficher le suivi de la température et le temps de cycle restant (figure 20).

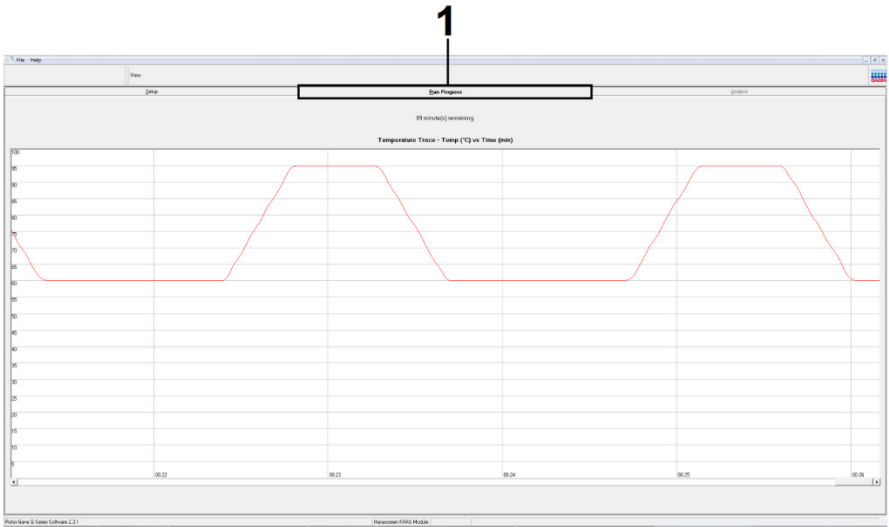


Figure 20. Onglet Run Progress (Progression du cycle).

À la fin du cycle, l'onglet Analysis (Analyse) s'ouvre automatiquement.

Remarque : Si l'onglet « Analysis » (Analyse) ne s'ouvre pas, cliquer dessus (figure 21).

Remarque : la méthode de calcul est expliquée dans la section Interprétation des résultats.

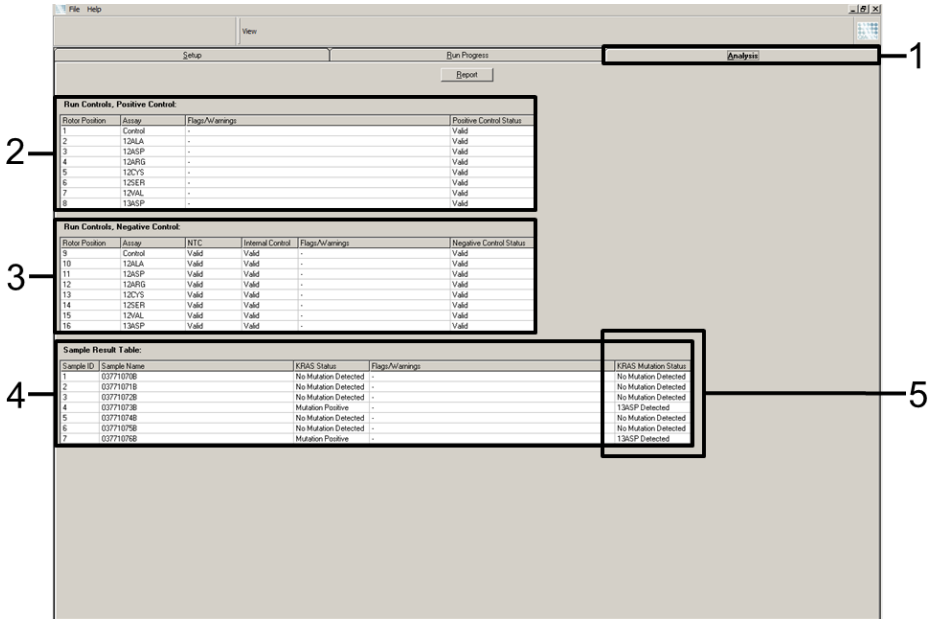


Figure 21. Onglet Analysis (Analyse) et rapport des résultats. 1 = onglet « Analysis » (Analyse), 2 = panneau « Run Controls, Positive Control » (Contrôles de cycles, contrôle positif), 3 = panneau « Run Controls, Negative Control » (Contrôles de cycles, contrôle négatif), 4 = « Sample Result Table » (Tableau des résultats d'échantillons), 5 = colonne « KRAS Mutation Status » (Statut mutationnel du gène KRAS).

Les résultats de dosages sont rapportés comme suit (figure 21).

- Panneau 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.

- Panneau Run Controls, Negative Control (Contrôles de cycles, contrôle négatif) : si les résultats du NTC (contrôle sans matrice) et du « Internal Control » (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.
- Panneau Sample Result Table (Tableau des résultats d’échantillons) : les mutations spécifiques sont rapportées pour les échantillons positifs à une mutation dans la colonne KRAS Mutation Status (Statut mutationnel du gène KRAS).

21. Pour générer des fichiers de rapports, cliquer sur Report (Rapport). La fenêtre Report Browser (Explorateur de rapports) s’affiche. Sélectionner KRAS Analysis Report (Rapport d’analyse de KRAS) sous Templates (Modèles), puis cliquer sur Show (Afficher) (figure 22).

Remarque : les rapports peuvent être enregistrés à un autre emplacement au format archives Web en cliquant sur le bouton Save As (Enregistrer sous) dans le coin supérieur gauche de chaque rapport.

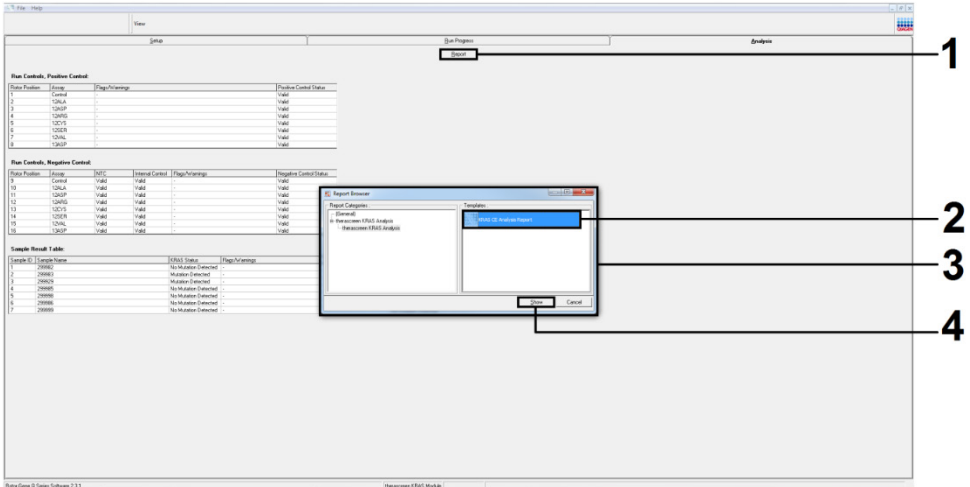


Figure 22. Sélection du modèle KRAS Analysis Report (Rapport d’analyse de KRAS). 1 = « Report » (Rapport), 2 = fenêtre « Report Browser » (Explorateur de rapports), 3 = sélection du modèle « KRAS Analysis Report » (Rapport d’analyse de KRAS), 4 = « Show » (Afficher).

Remarque pour les échantillons CPNPC uniquement : afin d'éviter d'annoncer un résultat de mutation G12C (12CYS) erroné, le ou les échantillons associés aux indicateurs indiqués ci-dessous doivent être interprétés comme non valides.

- SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT
- SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID
- SAMPLE_INT_CTRL_FAIL
- MUTATION_EARLY_CT
- SAMPLE_INVALID_DATA

Interprétation des résultats

L'analyse et les détections de mutations sont effectuées automatiquement par le Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS 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 Rotor Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package.

Analyse et détection des mutations

Le cycle de PCR pour lequel 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 2 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* KRAS RGQ PCR Kit, la valeur seuil est fixée à 0,05 unité de fluorescence relative. Cette valeur est configurée dans le *therascreen* KRAS Assay Package pour les canaux de fluorescence Green et Yellow. La valeur seuil a été définie lors du développement du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

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

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

Les contrôles de cycles (contrôle positif, NTC et contrôles internes) 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 déterminées en calculant la différence entre le C_T du dosage de mutation et le C_T du dosage de contrôle du même échantillon. Les échantillons sont classés comme positifs à une mutation si leur ΔC_T est inférieur ou égal à la valeur de ΔC_T seuil pour ce dosage. Au-dessus de cette valeur, l'échantillon peut soit contenir un pourcentage de mutations moindre par rapport à la capacité de détection du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (en deçà de la limite des dosages), soit être négatif aux mutations et être rapporté comme No Mutation Detected (Pas de mutation détectée).

L'absence d'amplification dans les réactions de mutations est rapportée en tant que No Mutation Detected (Pas de mutation détectée). Les valeurs de ΔC_T calculées à partir de l'amplification du bruit de 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 dosages s'affichent comme suit : « [mutation name] Detected » (Détection de [nom de la mutation]), « No Mutation Detected » (Pas de mutation détectée), « Invalid » (Non valide) ou, en cas d'échec d'un contrôle d'analyse, « Run Control Failed » (Échec du contrôle de cycle). Pour les échantillons positifs aux mutations, les mutations spécifiques sont rapportées.

Pour l'interprétation des indicateurs générés par le Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package, voir Indicateurs d'erreurs générés par le *therascreen* KRAS Assay Package.

Remarque : dans de rares cas, une tumeur peut contenir plusieurs mutations. Dans de tels cas, la mutation correspondant à la valeur de ΔC_T la plus faible est identifiée.

Limitations

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

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

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est utilisé dans le cadre d'une procédure d'amplification en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR). Comme pour toutes les procédures de PCR, les échantillons peuvent être contaminés par des sources d'ADN externes dans l'environnement des tests et par l'ADN du contrôle positif. Faire attention à ne pas contaminer les échantillons et les réactifs du mélange réactionnel.

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit n'est pas destiné au diagnostic d'une maladie en particulier.

Pour les échantillons de CCR, le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est uniquement destiné à distinguer entre les échantillons d'ADN mutant et ceux de type sauvage. Le test a été conçu pour que chaque réaction de mutation ait la meilleure sensibilité possible à la mutation spécifique mesurée. Toutefois, dans les échantillons pour lesquels une mutation est détectée, une réactivité croisée peut être observée avec d'autres réactions de mutations. Si plusieurs réactions de mutations sont positives, le résultat correspond au ΔC_T le plus faible.

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit n'est validé que pour les tissus de cancer colorectal ou de cancer du poumon non à petites cellules fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine.

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est validé uniquement pour une utilisation avec le QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Seul le Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM a été validé pour une utilisation avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Caractéristiques des performances

Performances analytiques

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

Seuil

À l'aide d'une méthode conforme à la directive EP17-A du CLSI (2004) (8), 225 échantillons FFPE ont été testés afin d'établir les seuils du dosage. L'intervalle de C_T de la réaction de contrôle a été établi comme s'étendant de 21,92 à 32,00. Les valeurs seuils, qui sont déterminées à partir de la différence entre le C_T de la réaction de contrôle et le C_T des réactions de mutations (ΔC_T), sont indiquées dans le tableau 9.

Tableau 9. Valeurs seuils établies pour chaque dosage de mutation.

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

Limite du blanc

Pour évaluer les performances du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit en l'absence de matrice positive aux mutations et pour garantir qu'un blanc ne génère pas de signal pouvant indiquer une faible concentration de mutation, des échantillons sans matrice ont été évalués. Les résultats n'ont révélé aucune valeur de C_T de contrôle ou de mutation détectable dans les tubes réactionnels de contrôle ou de mutation (les valeurs de C_T des contrôles internes étaient toutes valides).

Comparaison avec la méthode d'analyse de référence : CCR

Deux études ont été menées pour démontrer la concordance du statut mutationnel des échantillons de CCR testés avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit par rapport au séquençage bidirectionnel. Au total, 137 échantillons FFPE ont donné des résultats valides à la fois pour le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit et le séquençage bidirectionnel.

Les résultats globaux figurent dans le tableau 10. Le tableau 11 présente l'analyse de la concordance entre le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit et le séquençage bidirectionnel.

Tableau 10. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit par rapport au séquençage bidirectionnel Sanger

		Détection de mutations par séquençage bidirectionnel							Total	
		Nég.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL		13ASP
Détection du <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Négatif	80	–	–	1	–	–	–	1	82
	Positif à 12ALA	–	3	–	–	–	–	–	–	3
	Positif à 12ARG	–	–	–	1	–	–	–	–	1
	Positif à 12ASP	–	–	–	20	–	–	–	–	20
	Positif à 12CYS	–	–	–	–	3	–	–	–	3
	Positif à 12SER	–	–	–	–	–	–	–	–	0
	Positif à 12VAL	2	–	–	–	–	–	14	–	16
	Positif à 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	11	12
	Total	83	3	0	22	3	0	14	12	137

Tableau 11. Analyse de la concordance

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

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

L'analyse de la concordance a été effectuée sur 247 échantillons présentant des résultats valides à la fois pour le séquençage bidirectionnel et le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. 9 échantillons étaient discordants. Globalement, la concordance générale était de 96,4 %. Les données attestent de l'exactitude du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (tableau 13 et tableau 14).

Tableau 12. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit par rapport au séquençage bidirectionnel Sanger (seconde étude)

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

Tableau 13. Analyse de la concordance (seconde étude)

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

Comparaison avec la méthode d'analyse de référence : CPNPC

Pour démontrer la concordance du statut mutationnel global entre les échantillons de CPNPC testés avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit et les échantillons traités par séquençage bidirectionnel Sanger, des échantillons cliniques FFPE de CPNPC acquis par résection, BAT et BAAF ont été utilisés dans le cadre de cette étude. L'ADN a été extrait de chaque échantillon avant la réalisation du test avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Les résultats de ce test ont été comparés à ceux obtenus à l'aide du séquençage bidirectionnel Sanger.

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

La concordance entre le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit et le séquençage bidirectionnel est présentée dans le tableau 14. La détection d'une double mutation a eu lieu dans deux échantillons traités par séquençage bidirectionnel Sanger. Puisqu'une mutation était la même que le résultat du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, ces échantillons ont été classés comme concordants pour l'analyse de la concordance globale, de la concordance positive et de la concordance négative (Tableau 15).

Tableau 14. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit par rapport au séquençage bidirectionnel Sanger

Détection du <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Détection de mutations par séquençage bidirectionnel									Total
	Nég.	12ALA	12ALA_12CYS	12ARG	12ASP	12CYS	12CYS_12VAL	12VAL	13ASP	
Négatif	261	-	-	-	-	-	-	-	1	262
Positif à 12ALA	1	4	1	-	-	-	-	-	-	6
Positif à 12ARG	-	-	-	3	-	-	-	-	-	3
Positif à 12ASP	4	-	-	-	14	-	-	-	-	18
Positif à 12CYS	6	-	-	-	-	35	-	-	-	41
Positif à 12SER	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Positif à 12VAL	5	-	-	-	-	-	1	17	-	23
Positif à 13ASP	1	-	-	-	-	-	-	-	4	5
Total	280	4	1	3	14	35	1	17	5	360

Tableau 15. Analyse de la concordance

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

Limite de détection (Limit of Detection, LoD)

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

CCR

Une étude a été menée pour déterminer la LoD de chacune des 7 réactions spécifiques aux mutations intégrées dans le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Pour le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, la limite de détection d'ADN mutant sur un fond d'ADN de type sauvage est définie comme le plus faible facteur de dilution auquel 95 % des réplicats de tests pour chaque échantillon positif aux mutations ont été déterminés comme positifs.

Des modèles de régression logistique ont été appliqués individuellement à chaque dosage pour les jeux de données d'ADN introduit en quantité faible et élevé. Dans ces modèles, la variable d'intérêt était binaire, avec pour résultats possibles la détection de la mutation (détection = 1) ou l'absence de détection (détection = 0). La variable explicative continue était le \log_2 du pourcentage de dilution des mutations. Les LoD ont été calculées comme le pourcentage de dilution des mutations donnant une probabilité prédictive de détection de 0,95 (tableau 16).

Tableau 16. Valeurs de LoD pour chaque dosage de mutation utilisant des lignées cellulaires FFPE

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

CPNPC

La LoD pour les dosages du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a été déterminée et vérifiée à l'aide de tissu de CCR. Ces résultats de LoD ont été revérifiés pour le tissu de CPNPC.

L'étude comportait 2 parties. Dans la partie 1, 60 réplicats de 7 lignées cellulaires mutantes FFPE de CPNPC représentant chaque mutation ont été dilués à la LoD du dosage correspondant puis testés. Les 60 réplicats valides de lignées cellulaires FFPE pour chaque échantillon évalué présentaient une détection de 100 % pour leur réaction de mutation respective à la LoD évaluée.

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

Les 96 réplicats valides pour 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL et 13ASP présentaient un taux de détection correcte de 100 %. Les dosages pour 12CYS et 12SER présentaient un taux de détection de 95,8 % à la LoD.

Cela démontre que la valeur de LoD précédemment déterminée est confirmée pour tous les dosages de mutations lors de l'évaluation d'échantillons de tissus de CPNPC et d'échantillons FFPE cliniques de CPNPC / de lignées cellulaires FFPE / de patients appariés.

Quantité d'ADN introduit et linéarité

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

Lorsque des échantillons de différentes quantités d'ADN introduit contiennent la même proportion d'ADN mutant, les valeurs de ΔC_T mesurées doivent rester cohérentes. L'objectif de l'étude était de démontrer que les performances du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit étaient cohérentes sur tout l'intervalle d'entrée d'ADN (C_T de contrôle) du dosage. L'ADN extrait de 8 lignées cellulaires FFPE a été utilisé pour préparer des pools d'ADN avec le C_T de réaction de contrôle le plus faible possible. Les solutions mères d'ADN concentrés ont ensuite été dilués pour générer de l'ADN couvrant toute la plage de fonctionnement (total de 5 dilutions comprenant la solution mère concentrée initiale).

Pour chaque point de la plage de fonctionnement, un matériel suffisant a été préparé pour effectuer 6 tests de réplicats. La gamme de dilution pour chaque réaction de mutation et la valeur Δ de C_T moyenne obtenue à partir des résultats sont indiquées dans le tableau 17 et dans le tableau 18. Les valeurs de ΔC_T globales sont concordantes sur l'ensemble de la gamme de fonctionnement du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit pour tous les dosages, ce qui démontre que la quantité d'ADN n'a aucune influence sur l'exactitude de la détection des mutations dans les échantillons.

Tableau 17. Effet de la quantité d'ADN introduit sur les valeurs de ΔC_T dans l'intervalle de C_T de la réaction de contrôle ; lignées cellulaires FFPE de CCR

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

* Le nombre total de réplicats était de 27 pour 12ASP.

Tableau 18. Effet de la quantité d'ADN introduit sur les valeurs de ΔC_T dans l'intervalle de C_T de la réaction de contrôle ; lignées cellulaires FFPE de CPNPC

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

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

Linéarité/efficacité de l'amplification en fonction de la quantité d'ADN introduit

La linéarité et l'efficacité de l'amplification de la PCR ont été démontrées pour chaque réaction de mutation, par rapport à la réaction de contrôle, sur toute la gamme de fonctionnement du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. L'efficacité de l'amplification a été calculée pour chacune des réactions de mutation et pour la réaction de contrôle selon la formule $[10(-1/\text{pente})] - 1$.

L'efficacité de l'amplification du contrôle comparée à la réaction de mutation indique que la valeur ΔC_T , et donc la détection de mutation, est cohérente pour toute la plage de fonctionnement du test. Un résumé des données est présenté dans le tableau 19 (échantillons de CCR) et dans le tableau 20 (échantillons de CPNPC).

Tableau 19. Efficacité de l'amplification dans les réactions de mutations et de contrôle : lignées cellulaires de CCR

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

Tableau 20. Efficacité de l'amplification dans les réactions de mutations et de contrôle : échantillons de CPNPC

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

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

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet d'échantillons positifs aux mutations dilués en série sur l'efficacité de l'amplification, sur toute la gamme de fonctionnement du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, à partir de quantités introduites correspondant à un C_T d'environ 22–23 C_T.

Les extraits d'ADN de lignées cellulaires FFPE de CCR et d'échantillons de CPNPC ont d'abord été évalués par des mesures de la DO avant la réalisation de la PCR avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Les solutions mères d'ADN ont ensuite été préparées à un C_T de réaction de contrôle correspondant à environ 23 C_T . Les solutions mères ont été diluées en séries avec un facteur 2 à l'aide d'ADN de type sauvage, afin de maintenir constante la quantité totale d'ADN de type sauvage tout en faisant varier le pourcentage d'ADN mutant dans la matrice.

Des pools d'ADN suffisants pour 6 réplicats par mutation ont été préparés. Les données de C_T et ΔC_T ont été calculées pour chaque mutation à chaque point de dilution. Une régression linéaire a été effectuée avec les données du C_T de la réaction de mutation en fonction du \log_2 de la dilution de l'ADN introduit. L'étude a montré que la dilution des mutations sur un fond d'ADN de type sauvage en concentration constante entraînait seulement un faible écart de l'efficacité de l'amplification par rapport aux valeurs déterminées dans l'étude de linéarité décrite plus haut.

Substances interférentes

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de substances potentiellement interférentes sur les performances du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Elle a été menée en analysant l'impact de chaque substance sur les valeurs de ΔC_T et le statut mutationnel des échantillons de tests par l'intermédiaire d'expériences d'enrichissement à diverses concentrations. Puisqu'elles sont utilisées au cours du processus d'extraction de l'ADN, les substances potentiellement interférentes suivantes ont été testées : Buffer AL, Buffer ATL, éthanol, paraffine, protéinase K, tampon de lavage AW1, tampon de lavage AW2 et xylène. Le tampon d'élution finale du kit, le Buffer ATE, a également été testé en tant que blanc.

Aux concentrations susceptibles d'être rencontrées dans le cadre d'une utilisation normale, aucune des substances potentiellement interférentes évaluées n'affecte la capacité du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit à distinguer entre les échantillons positifs aux mutations et les échantillons négatifs.

Outre l'étude des substances interférentes, l'effet potentiel de la nécrose dans les échantillons cliniques a été évalué pour déterminer si de fortes proportions de tissus nécrosés dans les échantillons tumoraux peuvent affecter la capacité à générer des données valides. Sur un total de 421 échantillons évalués dans le cadre d'études de comparaison avec la méthode d'analyse de référence, 29 présentaient une proportion de nécrose > 50 % selon l'examen pathologique. Parmi ces 29 échantillons, 28 ont présenté des résultats valides concordants avec le séquençage bidirectionnel Sanger. Un seul résultat s'est avéré non valide en raison d'une quantité d'ADN insuffisante.

Contamination croisée

L'objectif de cette étude était de déterminer l'ampleur de la contamination croisée entre les échantillons d'ADN lors de l'utilisation du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, la contamination croisée étant susceptible d'entraîner des résultats faux positifs. Les sources potentielles de contamination croisée incluent :

- L'extraction des échantillons (p. ex. grattage des lames)
- Le pipetage des échantillons
- La fermeture (le bouchage) des tubes d'échantillons
- La contamination des réactifs du kit pendant l'utilisation
- Le chargement des tubes de dosages sur l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Pour cette étude, des étalons FFPE ont été utilisés : l'étalon de type sauvage et l'étalon 12ALA (puisque la réaction de 12ALA possède la LoD la plus faible dans le kit).

L'étude était constituée de 10 cycles de PCR conçus pour étudier le potentiel de contamination pendant et entre les cycles sur l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Lors de ces cycles de tests, les tubes contenant de l'ADN de type sauvage ont été utilisés pour tester la contamination par un ADN mutant.

Les résultats de cette étude n'ont révélé aucune contamination détectable dans aucun des extraits d'ADN de type sauvage utilisés pour détecter les contaminations croisées.

Exclusivité/réactivité croisée

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est constitué de 8 réactions distinctes : une seule réaction de contrôle pouvant détecter une région non polymorphe du gène KRAS et 7 réactions spécifiques aux mutations. Il n'y a aucune réaction pour mesurer spécifiquement la séquence KRAS de type sauvage dans les codons 12 ou 13. Le résultat KRAS No Mutation Detected (aucune mutation détectée) (c.-à-d. de type sauvage) est déterminé par l'absence de l'une des 7 mutations entraînant un résultat de mutation positif.

Par conséquent, il est nécessaire de démontrer l'ampleur de l'amplification non spécifique, ou la réactivité croisée, qui se produit dans chaque réaction avec des quantités excessives d'ADN du gène KRAS de type sauvage afin d'éviter l'obtention de résultats faux positifs. De la même manière, l'amplification non spécifique est évaluée pour les mutations KRAS que le dosage n'est pas censé détecter. Cela démontre que l'ampleur de la réactivité croisée entre les réactions de mutations n'entraîne pas d'erreur dans la détection des mutations en présence de quantités excessives d'ADN mutant. Puisque la quantité d'ADN introduit pour ce dosage est basée sur l'intervalle de C_T (21,92–32,00), la plus forte concentration d'ADN introduit est basée sur une valeur C_T de contrôle de 22 environ.

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

L'ampleur de l'amplification non spécifique d'ADN de type sauvage par des mélanges réactionnels conçus pour amplifier les mutations spécifiques a été évaluée. Au total, 60 réplicats d'ADN de lignées cellulaires FFPE de type sauvage et 60 échantillons de CPNPC ont été évalués à la plus haute concentration d'ADN amplifiable introduit à l'aide du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

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

Amplification non spécifique / réactivité croisée / exclusivité : ADN du gène KRAS positif à une mutation

Les échantillons mutants ayant une forte concentration d'ADN introduit ont été testés par rapport à tous les mélanges réactionnels. Les échantillons d'ADN ont été préparés à partir de chacune des lignées cellulaires FFPE de CCR et de CPNPC de façon à ce que la valeur de C_T de la réaction de contrôle corresponde approximativement à 23. À partir de ces dilutions, 6 réplicats de chaque échantillon de mutation ont été évalués. Le pourcentage de mutation dans l'échantillon dépendait du pourcentage de mutants dans l'ADN des lignées cellulaires.

Les valeurs de ΔC_T moyennes présentées dans le tableau 21 et dans le tableau 22 démontrent qu'il y a réactivité croisée entre les réactions de mutations. Dans tous les cas, les résultats démontrent que la mutation correcte a été détectée avec la réaction de mutation correspondante (la valeur de ΔC_T la plus faible était la détection de mutation correcte). Dans tous les autres cas de tests, les mutations n'étaient pas détectées ou se situaient en dehors du seuil de ΔC_T .

Tableau 21. Réactivité croisée (ΔC_T) entre les réactions de mutations avec de l'ADN de lignées cellulaires FFPE de CCR avec une quantité élevée d'ADN introduit

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

S.O. : pas de réaction croisée.

* Valeurs de ΔC_T des réactions appariées.

† ΔC_T des réactions croisées en dessous du seuil.

Tableau 22. Réactivité croisée (ΔC_T) entre les réactions de mutations avec de l'ADN de lignées cellulaires FFPE de CPNPC avec une quantité élevée d'ADN introduit

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

S.O. : pas de réaction croisée.

* Valeurs de ΔC_T des réactions appariées.

† ΔC_T des réactions croisées en dessous du seuil.

Répétabilité et reproductibilité

La précision du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a été déterminée à l'aide d'un protocole intégrant les aspects des normes CLSI EP12-A et EP5-A2 (21, 22). Des échantillons cliniques de CCR ont été utilisés pour cette évaluation. Un échantillon de type sauvage et un échantillon pour chaque mutation ont été testés avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit par 2 opérateurs sur chacun des 3 sites, en testant tous les échantillons et les contrôles avec 3 lots de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, tous les jours pendant 5 jours, avec 2 cycles par jour et 2 réplicats de chaque échantillon par cycle. Les valeurs C_T et ΔC_T obtenues pour chaque réaction dans chaque échantillon ont également été évaluées par une analyse de composante de variance.

Des échantillons mutants de faible niveau (3 x LoD) et des échantillons de type sauvage ont permis de mettre en évidence la reproductibilité du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, avec au moins 39/40 détections de mutation correctes, dans chacun des dosages avec de multiples lots, appareils et opérateurs, tant au cours des expériences de laboratoire qu'entre celles-ci. Des estimations de variance démontrées (équivalant à une fois l'écart type), à l'aide d'échantillons C50 et 3 x LoD, sont présentées dans les tableaux 23 et 24.

Tableau 23. Estimations de la variance des dosages

Dosage	%CV pour ΔC_T		%CV pour C_T mutant		%CV pour C_T de contrôle		
	3 x LoD	C50	3 x LoD	C50	3 x LoD	C50	WT
12ALA	13,14	8,32	1,87	2,02	0,97	1,12	1,12
12ARG	10,79	8,04	1,59	1,96	1,24	1,51	1,15
12ASP	12,86	5,87	1,11	1,00	0,90	0,90	1,04
12CYS	17,61	10,83	1,86	2,02	1,54	1,22	1,15
12SER	13,97	10,43	1,71	2,11	0,94	1,19	1,15
12VAL	9,66	15,47	1,52	1,65	1,11	3,74	1,26
13ASP	13,73	9,35	1,91	2,08	1,11	1,41	1,19

Tableau 24. Estimations de la précision de la répétabilité

Dosage	%CV pour ΔC_T		%CV pour C_T mutant		%CV pour C_T de contrôle		WT
	3 x LoD	C50	3 x LoD	C50	3 x LoD	C50	
12ALA	10,71	7,51	1,69	1,76	0,77	0,90	0,79
12ARG	9,83	8,04	1,21	1,76	0,84	1,33	0,90
12ASP	10,16	4,08	0,93	0,89	0,80	0,76	0,76
12CYS	13,15	8,80	1,31	1,76	1,40	1,01	0,76
12SER	6,76	6,18	1,10	1,48	0,80	0,90	0,90
12VAL	9,21	15,32	1,40	1,42	0,91	3,49	0,94
13ASP	8,67	7,01	1,30	1,65	0,91	1,19	0,97

La proportion estimée d'échantillons 3 x LoD testant les échantillons mutants et de type sauvage a été rapportée de manière générale et pour chacun des sites. Pour toutes les dosages et toutes les combinaisons d'échantillons, au moins 79 répliqués sur 80 ont présenté la détection de mutation correcte. La proportion globale de détections correctes était de 99,6 % (1 115/1 120) ; 99,6 % (558/560) pour les échantillons positifs à la mutation (3 x LoD) et 99,5 % (557/560) pour les échantillons n'ayant pas présenté de détection de mutation (type sauvage) (tableau 25).

Tableau 25. Détections correctes globalement

Mutation	Détections correctes	
	Échantillons 3 x LoD	Échantillons de type sauvage (faible)
12ALA	79/80	80/80
12ARG	80/80	79/80
12ASP	80/80	80/80
12CYS	79/80	80/80
12SER	80/80	79/80
12VAL	80/80	79/80
13ASP	80/80	80/80

CPNPC

La précision du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit intralaboratoire (répétabilité) a été évaluée. La justesse des résultats de détection des mutations et la précision des valeurs de ΔC_T (différence des valeurs de C_T entre une réaction de mutation et la réaction de contrôle) sont rapportées.

Au total, 15 membres du panel ont été préparés ; un pour chacune des 7 mutations détectées par le kit KRAS (à la LoD et 2 x LoD), et un membre du panel de type sauvage (Wild Type, WT). Les membres du panel mutants étaient représentés soit par une lignée cellulaire FFPE, soit par un échantillon clinique selon la disponibilité. Tous les échantillons ont été normalisés à un C_T de contrôle de 27 et les échantillons mutants ont été dilués dans de l'ADN de type sauvage pour produire suffisamment de matériel pour les échantillons à des niveaux de mutation de 1 x LoD et 2 x LoD.

La proportion de détections correctes est présentée dans le tableau 26 pour chaque panel de test et les valeurs de précision quantitative sont présentées dans le tableau 27.

Tableau 26. Proportion de détections de mutations correctes

Regroupement des variables		Proportion		Limite de confiance bilatérale à 95 %	
Niveau d'échantillon	Dosage	Fraction	Pourcentage	Inférieure	Supérieure
2 x LoD	12ALA	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
	12ARG*	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
	12ASP	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
	12CYS	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
	12SER*	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
	12VAL	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
	13ASP*	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
LoD	12ALA	39/40	97,50%	86,84%	99,94%
	12ARG	40/40	100,00%	91,19%	100,00%
	12ASP	40/40	100,00%	91,19%	100,00%
	12CYS	40/40	100,00%	91,19%	100,00%
	12SER*	40/40	100,00%	91,19%	100,00%
	12VAL	40/40	100,00%	91,19%	100,00%
	13ASP*	38/40	95,00%	83,08%	99,39%
WT	Tous	28/28	100,00%	87,66%	100,00%

* Représenté par une lignée cellulaire FFPE

Tableau 27. Composantes de variance en termes d'ET et de %CV – répétabilité

Variable d' analyse	Niveau d' échantillon	Dosage	Nbre d' observations	Moyenne	Entre Jour*	Entre N réaction*	Entre Rqqt*	Entre Lot du kit*	Entre Opérateur*	Résiduel*	Total
Delta C _T	2 x LoD	12ALA	28	5,54	(0,0000, 0,00 %)	(0,1221, 2,20 %)	(0,0443, 0,80 %)	(0,0385, 0,70 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1335, 2,41 %)	(0,1843, 3,33 %)
		12ARG	28	4,80	(0,0000, 0,00 %)	(0,1891, 3,94 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,3244, 6,76 %)	(0,3737, 7,79 %)
		12ASP	28	4,72	(0,0860, 1,82 %)	(0,1446, 3,06 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1463, 3,10 %)	(0,1374, 2,91 %)	(0,1751, 3,71 %)	(0,2797, 5,93 %)
		12CYS	28	5,66	(0,0563, 0,99 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0995, 1,76 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0390, 0,69 %)	(0,2306, 4,08 %)	(0,2498, 4,41 %)
		12SER	28	5,36	(0,1429, 2,67 %)	(0,0274, 0,51 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0647, 1,21 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1753, 3,27 %)	(0,2129, 3,97 %)
		12VAL	28	4,26	(0,0000, 0,00 %)	(0,1016, 2,39 %)	(0,0593, 1,39 %)	(0,1128, 2,65 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2095, 4,92 %)	(0,2457, 5,77 %)
		13ASP	28	5,23	(0,0000, 0,00 %)	(0,2892, 5,53 %)	(0,0157, 0,30 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2171, 4,15 %)	(0,3575, 6,83 %)
	LoD	12ALA	40	6,36	(0,0000, 0,00 %)	(0,1584, 2,49 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2346, 3,69 %)	(0,2819, 4,43 %)
		12ARG	40	5,45	(0,0036, 0,07 %)	(0,1639, 3,01 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0797, 1,46 %)	(0,1674, 3,07 %)	(0,2397, 4,40 %)
		12ASP	40	4,73	(0,0000, 0,00 %)	(0,2485, 5,25 %)	(0,1087, 2,30 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0816, 1,72 %)	(0,1041, 2,20 %)	(0,2837, 6,00 %)
		12CYS	40	6,62	(0,1688, 2,55 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2056, 3,11 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2909, 4,40 %)	(0,3652, 5,52 %)
		12SER	40	6,37	(0,1006, 1,58 %)	(0,3153, 4,95 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0340, 0,53 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2253, 3,54 %)	(0,3854, 6,05 %)
		12VAL	40	5,13	(0,2874, 5,60 %)	(0,0976, 1,90 %)	(0,0227, 0,44 %)	(0,0874, 1,71 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1629, 3,18 %)	(0,2965, 5,78 %)
		13ASP	38	6,26	(0,3433, 5,48 %)	(0,1227, 1,96 %)	(0,0778, 1,24 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,3459, 5,52 %)	(0,4738, 7,57 %)

* ET, %CV

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 26. Composantes de variance en termes d'ET et de %CV – répétabilité (suite)

Variable d' analyse	Niveau d' échantillon	Dosage	Nbre d' observations	Moyenne	Entre Jour*	Entre N réaction*	Entre Rgt*	Entre Lot du kit*	Entre Opérateur*	Résiduel*	Total
C _T du canal Green	2 x LoD	12ALA	28	32,09	(0,0000, 0,00 %)	(0,1314, 0,41 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0675, 0,21 %)	(0,1073, 0,33 %)	(0,1158, 0,36 %)	(0,1957, 0,61 %)
		12ARG	28	31,50	(0,0000, 0,00 %)	(0,2598, 0,82 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,3324, 1,06 %)	(0,4189, 1,33 %)
		12ASP	28	31,30	(0,0000, 0,00 %)	(0,1891, 0,60 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0920, 0,29 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1800, 0,58 %)	(0,2667, 0,85 %)
		12CYS	28	32,07	(0,0000, 0,00 %)	(0,2523, 0,79 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1606, 0,50 %)	(0,2011, 0,63 %)	(0,1512, 0,47 %)	(0,3388, 1,06 %)
		12SER	28	32,06	(0,0000, 0,00 %)	(0,2049, 0,64 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1250, 0,39 %)	(0,1177, 0,37 %)	(0,1263, 0,39 %)	(0,2648, 0,83 %)
		12VAL	28	30,65	(0,0000, 0,00 %)	(0,1772, 0,58 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1198, 0,39 %)	(0,1063, 0,35 %)	(0,1656, 0,54 %)	(0,2639, 0,86 %)
		13ASP	28	31,98	(0,0000, 0,00 %)	(0,3773, 1,18 %)	(0,0497, 0,16 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1813, 0,57 %)	(0,4138, 1,29 %)
	LoD	12ALA	40	32,86	(0,0000, 0,00 %)	(0,2332, 0,71 %)	(0,0516, 0,16 %)	(0,0840, 0,26 %)	(0,1319, 0,40 %)	(0,1780, 0,54 %)	(0,3144, 0,96 %)
		12ARG	40	31,90	(0,0000, 0,00 %)	(0,2186, 0,69 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2289, 0,72 %)	(0,1519, 0,48 %)	(0,3106, 0,97 %)
		12ASP	40	31,02	(0,0000, 0,00 %)	(0,1762, 0,57 %)	(0,1093, 0,35 %)	(0,1296, 0,42 %)	(0,2492, 0,80 %)	(0,1005, 0,32 %)	(0,2908, 0,94 %)
		12CYS	40	33,14	(0,1216, 0,37 %)	(0,0493, 0,15 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,3468, 1,05 %)	(0,0501, 0,15 %)	(0,3155, 0,95 %)	(0,4216, 1,27 %)
		12SER	40	33,08	(0,0832, 25 %)	(0,2591, 0,78 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2424, 0,73 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2258, 0,68 %)	0,3864, 1,17 %
		12VAL	40	31,62	(0,2858, 0,90 %)	(0,0951, 0,30 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2244, 0,71 %)	(0,0344, 0,11 %)	(0,1763, 0,56 %)	0,3432, 1,09 %
		13ASP	38	33,09	(0,3237, 0,98 %)	(0,1009, 0,31 %)	(0,1409, 0,43 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2785, 0,84 %)	0,4133,

* ET, %CV

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 26. Composantes de variance en termes d'ET et de %CV – répétabilité (suite)

Variable d' analyse	Niveau d' échantillon	Dosage	Nbre d' observations	Moyenne	Entre Jour*	Entre N réaction*	Entre Rgt*	Entre Lot du kit*	Entre Opérateur*	Résiduel*	Total
C _T du canal Yellow	2 x LoD	12ALA	28	33,20	(0,0000, 0,00 %)	(0,0515, 0,16 %)	(0,0330, 0,10 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0607, 0,18 %)	(0,2117, 0,64 %)	(0,2235, 0,67 %)
		12ARG	28	33,05	(0,1397, 0,42 %)	(0,1321, 0,40 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2393, 0,72 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,3792, 1,15 %)	(0,4559, 1,38 %)
		12ASP	28	33,00	(0,0597, 0,18 %)	(0,2131, 0,65 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1313, 0,40 %)	(0,1954, 0,59 %)	(0,3059, 0,93 %)
		12CYS	28	33,19	(0,0646, 0,19 %)	(0,0971, 0,29 %)	(0,0233, 0,07 %)	(0,0679, 0,20 %)	(0,0863, 0,26 %)	(0,1943, 0,59 %)	(0,2378, 0,72 %)
		12SER	28	32,85	(0,0525, 0,16 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0337, 0,10 %)	(0,0937, 0,29 %)	(0,1320, 0,40 %)	(0,1588, 0,48 %)
		12VAL	28	33,11	(0,0000, 0,00 %)	(0,1026, 0,31 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1469, 0,44 %)	(0,1469, 0,44 %)	(0,2912, 0,88 %)	(0,3458, 1,04 %)
		13ASP	28	33,03	(0,0000, 0,00 %)	(0,1928, 0,58 %)	(0,1015, 0,31 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1450, 0,44 %)	(0,2493, 0,75 %)
	LoD	12ALA	40	33,37	(0,0000, 0,00 %)	(0,2010, 0,60 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1942, 0,58 %)	(0,2177, 0,65 %)	(0,3257, 0,98 %)
		12ARG	40	33,14	(0,0000, 0,00 %)	(0,2168, 0,65 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,3061, 0,92 %)	(0,1637, 0,49 %)	(0,1748, 0,53 %)	(0,3717, 1,12 %)
		12ASP	40	32,98	(0,0000, 0,00 %)	(0,2599, 0,79 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1735, 0,53 %)	(0,2228, 0,68 %)	(0,3618, 1,10 %)
		12CYS	40	33,31	(0,0000, 0,00 %)	(0,2028, 0,61 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1209, 0,36 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2132, 0,64 %)	(0,3050, 0,92 %)
		12SER	40	33,08	(0,1254, 0,38 %)	(0,2847, 0,86 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1505, 0,46 %)	(0,3263, 0,99 %)
		12VAL	40	33,29	(0,3133, 0,94 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2621, 0,79 %)	(0,3574, 1,07 %)
		13ASP	40	33,13	(0,1101, 0,33 %)	(0,1326, 0,40 %)	(0,1666, 0,50 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1925, 0,58 %)	(0,2804, 0,85 %)

* ET, %CV

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 26. Composantes de variance en termes d'ET et de %CV – répétabilité (suite)

Variable d' analyse	Niveau d' échantillon	Dosage	Nbre d' observations	Moyenne	Entre Jour*	Entre N réaction*	Entre Rgq*	Entre Lot du kit*	Entre Opérateur*	Résiduel*	Total
C _T du canal Yellow	WT	12ALA	28	33,41	(0,1443, 0,43 %)	(0,1997, 0,60 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2269, 0,68 %)	(0,3248, 0,97 %)
		12ARG	28	33,30	(0,0875, 0,26 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,4098, 1,23 %)	(0,0904, 0,27 %)	(0,2368, 0,71 %)	(0,3983, 1,20 %)
		12ASP	28	33,12	(0,1591, 0,48 %)	(0,1748, 0,53 %)	(0,0477, 0,14 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2131, 0,64 %)	(0,3075, 0,93 %)
		12CYS	28	33,42	(0,0000, 0,00 %)	(0,2009, 0,60 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1444, 0,43 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2121, 0,63 %)	(0,3077, 0,92 %)
		12SER	28	33,22	(0,2485, 0,75 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0633, 0,19 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1497, 0,45 %)	(0,2517, 0,76 %)
		12VAL	28	33,35	(0,0000, 0,00 %)	(0,2591, 0,78 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1429, 0,43 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2721, 0,82 %)	(0,3863, 1,16 %)
		13ASP	28	33,45	(0,0000, 0,00 %)	(0,1194, 0,36 %)	(0,0526, 0,16 %)	(0,0341, 0,10 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1651, 0,49 %)	(0,2078, 0,62 %)

* ET, %CV

La précision du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit interlaboratoire (reproductibilité) a été évaluée. Trois laboratoires différents (sites de test) ont été utilisés. Le même panel de test a été utilisé pour cette étude que pour l'étude de répétabilité. Sur chaque site, les conditions de laboratoire ont été modifiées par appareil RGQ, par opérateur, par lot de kit KRAS et par analyses par jour pour donner un total de 88 analyses par site sur 22 jours non consécutifs.

Le taux de détections de mutations correctes est indiqué dans le tableau 28. Le tableau 29 détaille les valeurs de précision quantitative. La reproductibilité totale du kit KRAS est indiquée dans la colonne Total (ET, %CV) du tableau 29.

Tableau 28. Proportion de détections de mutations correctes sur tous les sites

Regroupement des variables		Proportion		Limite de confiance bilatérale à 95 %	
Niveau d'échantillon	Dosage	Fraction	Pourcentage	Inférieure	Supérieure
2 x LoD	12ALA	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
	12ARG*	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
	12ASP	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
	12CYS	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
	12SER*	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
	12VAL	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
	13ASP*	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
LoD	12ALA	118/120	98,33%	94,11%	99,80%
	12ARG	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	12ASP	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	12CYS	119/120	99,17%	95,44%	99,98%
	12SER*	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	12VAL	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	13ASP*	118/120	98,33%	94,11%	99,80%
WT	Tous	82/84	97,62%	91,66%	99,71%

* Représenté par une lignée cellulaire FFPE

Tableau 29. Composantes de variance en termes d'ET et de %CV – reproductibilité

Variable d' analyse	Niveau d' échantillon	Dosage	Nbre d' observations	Moyenne	Entre différents sites*	Entre différents jours sur un même site*	Entre nombre d' analyses sur un même site*	Entre Pqqs sur un même site*	Entre différents lots de kit sur un même site*	Entre différents opérateurs sur un même site*	Résiduel*	Total
Delta C _t	2 x LoD	12ALA	84	5,48	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1669, 3,05 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1287, 2,35 %)	(0,1679, 3,07 %)	(0,2640, 4,82 %)
		12ARG	84	4,81	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1172, 2,43 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2729, 5,67 %)	(0,2967, 6,16 %)
		12ASP	84	4,57	(0,0000, 0,00 %)	(0,0943, 2,06 %)	(0,1457, 3,19 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0600, 1,31 %)	(0,1718, 3,76 %)	(0,1565, 3,43 %)	(0,2854, 6,25 %)
		12CYS	84	5,61	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2060, 3,67 %)	(0,0264, 0,47 %)	(0,0698, 1,24 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1671, 2,98 %)	(0,2728, 4,87 %)
		12SER	84	5,34	(0,0000, 0,00 %)	(0,1362, 2,55 %)	(0,1669, 3,13 %)	(0,1527, 2,86 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2020, 3,79 %)	(0,2382, 4,46 %)	(0,3902, 7,31 %)
		12VAL	84	4,13	(0,0874, 2,11 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1677, 4,06 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0869, 2,10 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2711, 6,56 %)	(0,3359, 8,12 %)
	13ASP	84	5,22	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2161, 4,14 %)	(0,2712, 5,20 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1930, 3,70 %)	(0,2275, 4,36 %)	(0,4279, 8,20 %)	
	LoD	12ALA	119	6,33	(0,0000, 0,00 %)	(0,0410, 0,65 %)	(0,1207, 1,91 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0247, 0,39 %)	(0,2640, 4,17 %)	(0,2936, 4,64 %)
		12ARG	120	5,42	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1797, 3,31 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1872, 3,45 %)	(0,2590, 4,78 %)
		12ASP	120	4,66	(0,1183, 2,54 %)	(0,0646, 1,38 %)	(0,2121, 4,55 %)	(0,0261, 0,56 %)	(0,0217, 0,46 %)	(0,0440, 0,94 %)	(0,1455, 3,12 %)	(0,2862, 6,14 %)
		12CYS	120	6,54	(0,0000, 0,00 %)	(0,0132, 0,20 %)	(0,1775, 2,72 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1621, 2,48 %)	(0,1708, 2,61 %)	(0,4202, 6,43 %)	(0,4981, 7,62 %)
		12SER	120	6,28	(0,0000, 0,00 %)	(0,0824, 1,31 %)	(0,2271, 3,62 %)	(0,0775, 1,24 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2383, 3,80 %)	(0,3164, 5,04 %)	(0,4570, 7,28 %)
		12VAL	120	5,05	(0,0315, 0,62 %)	(0,1648, 3,26 %)	(0,0955, 1,89 %)	(0,0703, 1,39 %)	(0,0320, 0,63 %)	(0,0795, 1,57 %)	(0,2120, 4,20 %)	(0,2965, 5,87 %)
13ASP		118	6,17	(0,0000, 0,00 %)	(0,1673, 2,71 %)	(0,1987, 3,22 %)	(0,2332, 3,78 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0843, 1,37 %)	(0,3075, 4,99 %)	(0,4488, 7,28 %)	

** ET, %CV

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 29. Composantes de variance en termes d'ET et de %CV – reproductibilité (suite)

Variable d' analyse	Niveau d' échantillon	Dosage	Nbre d' observations	Moyenne	Entre différents sites*	Entre différents jours sur un même site*	Entre nbre d' analyses sur un même site*	Entre Rgq sur un même site	Entre différents lots de kit sur un même site*	Entre différents opérateurs sur un même site*	Résiduel*	Total
Ct du canal Green	2 x LoD	12ALA	84	32,13	(0,1578, 0,49 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2509, 0,78 %)	(0,0745, 0,23 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1249, 0,39 %)	(0,1362, 0,42 %)	(0,3390, 1,06 %)
		12ARG	84	31,61	(0,0882, 0,28 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2430, 0,77 %)	(0,1339, 0,42 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2604, 0,82 %)	(0,3828, 1,21 %)
		12ASP	84	31,24	(0,1655, 0,53 %)	(0,0391, 0,13 %)	(0,2178, 0,70 %)	(0,0600, 0,19 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2052, 0,66 %)	(0,1426, 0,46 %)	(0,3542, 1,13 %)
		12CYS	84	32,15	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2836, 0,88 %)	(0,0852, 0,26 %)	(0,0940, 0,29 %)	(0,1658, 0,52 %)	(0,1318, 0,41 %)	(0,3636, 1,13 %)
		12SER	84	32,14	(0,1457, 0,45 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2659, 0,83 %)	(0,1807, 0,56 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2715, 0,84 %)	(0,1783, 0,55 %)	(0,4554, 1,42 %)
		12VAL	84	30,69	(0,0646, 0,21 %)	(0,0480, 0,16 %)	(0,2124, 0,69 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1031, 0,34 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2000, 0,65 %)	(0,3143, 1,02 %)
		13ASP	84	32,12	(0,2111, 0,66 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,3218, 1,00 %)	(0,2966, 0,92 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1743, 0,54 %)	(0,1980, 0,62 %)	(0,5184, 1,61 %)
LoD		12ALA	119	32,93	(0,0000, 0,00 %)	(0,1524, 0,46 %)	(0,1821, 0,55 %)	(0,1048, 0,32 %)	(0,0757, 0,23 %)	(0,1007, 0,31 %)	(0,2526, 0,77 %)	(0,3721, 1,13 %)
		12ARG	120	31,98	(0,0000, 0,00 %)	(0,0743, 0,23 %)	(0,1936, 0,61 %)	(0,1262, 0,39 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1332, 0,42 %)	(0,1619, 0,51 %)	(0,3096, 0,97 %)
		12ASP	120	31,06	(0,1880, 0,61 %)	(0,1184, 0,38 %)	(0,1681, 0,54 %)	(0,1033, 0,33 %)	(0,1171, 0,38 %)	(0,1481, 0,48 %)	(0,1333, 0,43 %)	(0,3511, 1,13 %)
		12CYS	120	33,19	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2513, 0,76 %)	(0,0776, 0,23 %)	(0,2128, 0,64 %)	(0,1427, 0,43 %)	(0,2712, 0,82 %)	(0,4401, 1,33 %)
		12SER	120	33,13	(0,2194, 0,66 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2433, 0,73 %)	(0,1263, 0,38 %)	(0,1470, 0,44 %)	(0,1973, 0,60 %)	(0,2052, 0,62 %)	(0,4437, 1,34 %)
		12VAL	120	31,65	(0,0000, 0,00 %)	(0,1254, 0,40 %)	(0,1645, 0,52 %)	(0,1307, 0,41 %)	(0,1271, 0,40 %)	(0,0976, 0,31 %)	(0,1792, 0,57 %)	(0,3159, 1,00 %)
		13ASP	118	33,08	(0,0000, 0,00 %)	(0,1789, 0,54 %)	(0,1661, 0,50 %)	(0,3569, 1,08 %)	(0,0649, 0,20 %)	(0,1565, 0,47 %)	(0,2588, 0,78 %)	(0,4894, 1,48 %)

** ET, %CV

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 29. Composantes de variance en termes d'ET et de %CV – reproductibilité (suite)

Variable d'analyse	Niveau d'échantillon	Dosage	Nbre d'observations	Moyenne	Entre différents sites*	Entre différents jours sur un même site*	Entre nbre d'analyses sur un même site*	Entre Rgq sur un même site*	Entre différents lots de kit sur un même site*	Entre différents opérateurs sur un même site*	Résiduel*	Total
Cr du canal Yellow	2 x LoD	12ALA	84	33,25	(0,0706, 0,21 %)	(0,0399, 0,12 %)	(0,1314, 0,40 %)	(0,1303, 0,39 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1124, 0,34 %)	(0,1913, 0,58 %)	(0,2883, 0,87 %)
		12ARG	84	33,07	(0,0000, 0,00 %)	(0,1406, 0,43 %)	(0,1353, 0,41 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2024, 0,61 %)	(0,1262, 0,38 %)	(0,2831, 0,86 %)	(0,4016, 1,21 %)
		12ASP	84	32,98	(0,0000, 0,00 %)	(0,0480, 0,15 %)	(0,1706, 0,52 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0797, 0,24 %)	(0,1795, 0,54 %)	(0,2616, 0,79 %)
		12CYS	84	33,20	(0,0000, 0,00 %)	(0,0976, 0,29 %)	(0,1781, 0,54 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1454, 0,44 %)	(0,1723, 0,52 %)	(0,2939, 0,89 %)
		12SER	84	32,91	(0,0000, 0,00 %)	(0,1101, 0,33 %)	(0,0549, 0,17 %)	(0,0669, 0,20 %)	(0,0677, 0,21 %)	(0,1186, 0,36 %)	(0,2274, 0,69 %)	(0,2916, 0,89 %)
		12VAL	84	33,17	(0,0688, 0,21 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1896, 0,57 %)	(0,0937, 0,28 %)	(0,1140, 0,34 %)	(0,1311, 0,40 %)	(0,2605, 0,79 %)	(0,3768, 1,14 %)
		13ASP	84	33,10	(0,0000, 0,00 %)	(0,0482, 0,15 %)	(0,2035, 0,61 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0466, 0,14 %)	(0,1460, 0,44 %)	(0,1688, 0,51 %)	(0,3019, 0,91 %)
		LoD	LoD	12ALA	119	33,33	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2108, 0,63 %)	(0,0820, 0,25 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1443, 0,43 %)
12ARG	120			33,15	(0,1092, 0,33 %)	(0,0537, 0,16 %)	(0,1605, 0,48 %)	(0,0507, 0,15 %)	(0,2157, 0,65 %)	(0,1276, 0,39 %)	(0,2180, 0,66 %)	(0,3749, 1,13 %)
12ASP	120			32,96	(0,0000, 0,00 %)	(0,0832, 0,25 %)	(0,2022, 0,61 %)	(0,0864, 0,26 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1117, 0,34 %)	(0,2223, 0,67 %)	(0,3343, 1,01 %)
12CYS	120			33,26	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2232, 0,67 %)	(0,1691, 0,51 %)	(0,0789, 0,24 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2097, 0,63 %)	(0,3516, 1,06 %)
12SER	120			33,01	(0,1573, 0,48 %)	(0,0716, 0,22 %)	(0,2134, 0,65 %)	(0,0951, 0,29 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0784, 0,24 %)	(0,1689, 0,51 %)	(0,3263, 0,99 %)
12VAL	120			33,25	(0,1519, 0,46 %)	(0,1960, 0,59 %)	(0,1272, 0,38 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1298, 0,39 %)	(0,0553, 0,17 %)	(0,2162, 0,65 %)	(0,3487, 1,05 %)
13ASP	118			33,16	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1768, 0,53 %)	(0,0998, 0,30 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1973, 0,59 %)	(0,2802, 0,84 %)

** ET, %CV

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 29. Composantes de variance en termes d'ET et de %CV – reproductibilité (suite)

Variable d' analyse	Niveau d' échantillon	Dosage	Nbre d' observations	Moyenne	Entre différents sites*	Entre différents jours sur un même site*	Entre nbre d' analyses sur un même site*	Entre Rgq sur un même site*	Entre différents lots de kit sur un même site*	Entre différents opérateurs sur un même site*	Résiduel*	Total
WT	12ALA	84	33,44	(0,1257, 0,38 %)	(0,0961, 0,29 %)	(0,1845, 0,55 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2083, 0,62 %)	(0,3104, 0,93 %)	
	12ARG	84	33,37	(0,1191, 0,36 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1869, 0,56 %)	(0,1321, 0,40 %)	(0,2529, 0,76 %)	(0,1205, 0,36 %)	(0,2132, 0,64 %)	(0,4217, 1,26 %)	
	12ASP	84	33,16	(0,0574, 0,17 %)	(0,0738, 0,22 %)	(0,2162, 0,65 %)	(0,0563, 0,17 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1844, 0,56 %)	(0,2997, 0,90 %)	
	12CYS	84	33,42	(0,0000, 0,00 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1964, 0,59 %)	(0,0720, 0,22 %)	(0,1311, 0,39 %)	(0,0262, 0,08 %)	(0,2258, 0,68 %)	(0,3287, 0,98 %)	
	12SER	84	33,20	(0,0812, 0,24 %)	(0,1331, 0,40 %)	(0,1734, 0,52 %)	(0,0329, 0,10 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,2009, 0,61 %)	(0,1923, 0,58 %)	(0,3535, 1,06 %)	
	12VAL	84	33,41	(0,0000, 0,00 %)	(0,0695, 0,21 %)	(0,2046, 0,61 %)	(0,0000, 0,00 %)	(0,1708, 0,51 %)	(0,1437, 0,43 %)	(0,2339, 0,70 %)	(0,3799, 1,14 %)	
	13ASP	84	33,46	(0,0000, 0,00 %)	(0,0613, 0,18 %)	(0,1802, 0,54 %)	(0,0744, 0,22 %)	(0,0073, 0,02 %)	(0,0969, 0,29 %)	(0,1790, 0,53 %)	(0,2816, 0,84 %)	

Variabilité dans la manipulation des échantillons

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de la variabilité dans la manipulation des échantillons, en particulier durant l'extraction de l'ADN, sur le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Cette étude complète l'étude de répétabilité et de reproductibilité en analysant la variabilité dans la manipulation des échantillons se produisant lorsque les mêmes coupes FFPE cliniques et les mêmes coupes de lignées cellulaires FFPE étaient traitées sur 3 sites, puis testées avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

CCR

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

Une comparaison par site des valeurs de DCT moyennes pour les échantillons mutants et de type sauvage a révélé une très bonne concordance des résultats. Les résultats démontrent la concordance de la procédure d'extraction de l'ADN et du traitement des échantillons en lien avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

CPNPC

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

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

Lorsque toutes les préparations d'échantillons sur les 3 sites de tests individuels ont été testées avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, chacune des 7 mutations et chacun des échantillons de type sauvage ont été identifiés avec la détection de la bonne mutation. La détection globale pour chacune des 7 mutations et les échantillons de type sauvage était de 100 %, démontrant la cohérence intersite pour l'extraction de l'ADN et la détection des mutations à l'aide du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Une étude supplémentaire sur la manipulation des échantillons a été réalisée à l'aide d'échantillons de CPNPC cliniques de FFPE cliniques représentatifs des mutations 12ALA, 12ARG, 12SER et 13ASP, étant donné que l'étude précédente utilisait des échantillons de lignées cellulaires représentatifs de ces mutations. Cette étude supplémentaire a été conçue de la même manière que l'étude précédente. Toutes les préparations d'échantillons pour échantillons mutants 12ALA, 12ARG et 13ASP extraits sur les trois sites de test individuels ont donné lieu à une détection de mutation correcte lors des tests avec le kit KRAS. Dans l'ensemble, les détections correctes pour ces échantillons étaient de 100 %. Les préparations des échantillons pour les mutations 12SER ont donné lieu à une fréquence de détection des mutations correcte de 28/30 (pourcentage de détection correcte égal à 93,33 %) sur les trois sites de test individuels. Les résultats démontrent la concordance de la procédure d'extraction de l'ADN et du flux de travail de traitement des échantillons utilisé avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

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

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

Pour cette étude, des échantillons de BAT et de BAAF « appariés aux patients » ont été dérivés d'échantillons tumoraux obtenus par résection chirurgicale afin de prélever la même tumeur avec les 3 méthodes d'acquisition. Chaque échantillon a été extrait et testé avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Chaque échantillon a été extrait et testé avec le dosage de contrôle KRAS. Chaque échantillon donnant un résultat valide (169 résections, 169 BAT et 164 BAAF) a été testé avec les 8 dosages KRAS.

L'analyse primaire était basée sur la mutation spécifique détectée parmi les différents types de prélèvement. Les mesures de pourcentage de concordance globale, de pourcentage de concordance positive et de pourcentage de concordance négative ont été calculées en même temps que la limite de confiance bilatérale exacte à 95 % pour chaque comparaison au niveau des paires.

Tableau 30. Concordance entre les méthodes de prélèvement des échantillons

Comparaison	Concordance	Fréquences	Pourcentage (%)	Limite de confiance bilatérale inférieure	Limites de confiance bilatérale à 95 % supérieure
Comparaison BAT/BAAF avec BAT comme référence	Pourcentage de concordance globale	148/156	94,87	90,15	97,76
	Pourcentage de concordance positive	29/35	82,86	66,35	93,44
	Pourcentage de concordance négative	119/121	98,35	94,16	99,80
Comparaison BAT/RES avec BAT comme référence	Pourcentage de concordance globale	153/161	95,03	90,44	97,83
	Pourcentage de concordance positive	31/37	83,78	67,99	93,81
	Pourcentage de concordance négative	122/124	98,39	94,30	99,80
Comparaison BAAF/BAT avec BAAF comme référence	Pourcentage de concordance globale	148/156	94,87	90,15	97,76
	Pourcentage de concordance positive	29/32	90,63	74,98	98,02
	Pourcentage de concordance négative	119/124	95,97	90,84	98,68
Comparaison BAAF/RES avec BAAF comme référence	Pourcentage de concordance globale	152/156	97,44	93,57	99,30
	Pourcentage de concordance positive	30/32	93,75	79,19	99,23
	Pourcentage de concordance négative	122/124	98,39	94,30	99,80

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 29. Concordance entre les méthodes de prélèvement des échantillons (suite)

Comparaison	Concordance	Fréquences	Pourcentage (%)	Limite de confiance bilatérale inférieure	Limites de confiance bilatérale à 95 % supérieure
Comparaison RES/BAT avec RES comme référence	Pourcentage de concordance globale	153/161	95,03	90,44	97,83
	Pourcentage de concordance positive	31/34	91,18	76,32	98,14
	Pourcentage de concordance négative	122/127	96,06	91,05	98,71
Comparaison RES/BAAF avec RES comme référence	Pourcentage de concordance globale	152/156	97,44	93,57	99,30
	Pourcentage de concordance positive	30/32	93,75	79,19	99,23
	Pourcentage de concordance négative	122/124	98,39	94,30	99,80

De plus, une analyse de régression de Passing-Bablok et Deming a été effectuée pour comparer les valeurs C_T et ΔC_T entre différentes méthodes de prélèvement des échantillons. L'analyse de régression a démontré l'absence de preuve indiquant l'existence d'une différence constante ou proportionnelle entre les types d'échantillons RES, BAT et BAAF en termes de C_T ou ΔC_T . Une analyse de régression linéaire a également été effectuée pour étudier l'effet du pourcentage de tissu nécrotique et tumoral sur les valeurs ΔC_T pertinentes. La pente de la ligne de régression pour les tumeurs nécrotiques et pour le pourcentage de tumeur par rapport à ΔC_T indique l'absence de preuve indiquant l'existence d'une différence significative dans les valeurs de ΔC_T avec des valeurs croissantes du pourcentage ou du tissu nécrotique ou tumoral.

Performances cliniques

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est conçu pour détecter de manière spécifique 7 mutations KRAS dans les codons 12 et 13 du gène KRAS. Il n'est pas conçu pour détecter spécifiquement la séquence de type sauvage au niveau de ces codons. Les résultats du test sont signalés comme « [mutation name] Detected » ([nom de mutation] détectée) et « No Mutation Detected » (Aucune mutation détectée). Dans les études cliniques présentées ci-dessous, les résultats positifs à la mutation KRAS correspondent à des patients dont le tissu tumoral était positif pour une ou plusieurs des 7 mutations détectées par le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S, G12V, G13D). Les résultats négatifs à la mutation KRAS (type sauvage) correspondent à des patients dont le tissu tumoral était négatif pour les 7 mutations détectées par le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (c.-à-d. que l'échantillon peut, en réalité, contenir des mutations du gène KRAS qui n'ont pas été identifiées par le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit).

Étude clinique étayant l'utilisation d'Erbitux (cétuximab)

Une étude de performances cliniques a été réalisée afin de générer des données à l'appui de l'utilité clinique du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit comme outil de diagnostic permettant de sélectionner des patients pour un traitement à base d'Erbitux (cétuximab). L'innocuité et l'efficacité d'Erbitux (cétuximab) ont été démontrées dans l'étude CA225025. CA225025 était un essai clinique randomisé multicentrique ouvert mené chez 572 patients atteints d'un CCR métastatique (CCRM) récidivant exprimant l'EGFR, précédemment traité. Les patients ont été randomisés (1:1) pour recevoir soit Erbitux (cétuximab) complété par les meilleurs soins de soutien (BSC), soit les BSC seuls. Erbitux (cétuximab) a été administré à la dose initiale de 400 mg/m², suivi de 250 mg/m² par semaine jusqu'à ce que la maladie progresse ou que la toxicité devienne inacceptable.

Sur les 572 patients randomisés, l'âge médian était de 63 ans ; 64 % étaient des hommes, 89 % étaient des blancs et 77 % avaient un score de performance ECOG de 0 à 1. Les données démographiques et les caractéristiques de référence étaient similaires entre les différents bras de l'étude. Tous les patients devaient avoir reçu et avoir vu la maladie progresser avec un traitement antérieur, y compris un traitement contenant de l'irinotécan et un traitement contenant de l'oxaliplatine.

Le statut de mutation *KRAS* était disponible pour 453/572 (79 %) des patients : 245 (54 %) patients présentaient des tumeurs négatives aux mutations *KRAS* et 208 (46 %) patients présentaient des tumeurs positives aux mutations *KRAS* lorsqu'ils ont été évalués par le *therascreen KRAS RGQ PCR Kit*.

Le principal critère d'évaluation de l'étude était la survie globale (SG). Pour la population négative aux mutations *KRAS* (type sauvage), le temps de survie médian (IC à 95 %) était de 8,6 (7,0, 10,3) mois dans le groupe Erbitux (cétuximab)+BSC et de 5,0 (4,3, 5,7) mois dans le groupe BSC. Le rapport de risque SG d'Erbitux (cétuximab)+BSC par rapport à BSC était de 0,63. L'intervalle de confiance (IC) de 95 % était (0,47, 0,84).

Pour la population positive aux mutations *KRAS*, le temps de survie médian était de 4,8 (3,9, 5,6) mois dans le groupe Erbitux (cétuximab)+BSC et de 4,6 (3,6, 4,9) mois dans le groupe BSC. Le rapport de risque était de 0,91 avec un IC de 95 % (0,67, 1,24). Les résultats sont présentés dans le tableau 31 et la figure 23.

Tableau 31. Survie globale dans le cancer colorectal métastatique exprimant l'EGFR précédemment traité (tous randomisés et statut KRAS)

	Tous randomisés		Type sauvage Mutation KRAS négative		Mutation KRAS positive	
	Erbitux+BSC N=287	BSC N=285	Erbitux+BSC N=117	BSC N=128	Erbitux+BSC N=108	BSC N=100
Médiane (mois) (IC à 95 %)	6,1 (5,4, 6,7)	4,6 (4,2, 4,9)	8,6 (7,0, 10,3)	5,0 (4,3, 5,7)	4,8 (3,9, 5,6)	4,6 (3,6, 4,9)
Rapport de risque (IC à 95 %)	0,77 (0,64, 0,92)		0,63 (0,47, 0,84)		0,91 (0,67, 1,24)	
Valeur p*	0,0046		-		-	

* Basée sur le test de rang logarithmique stratifié.

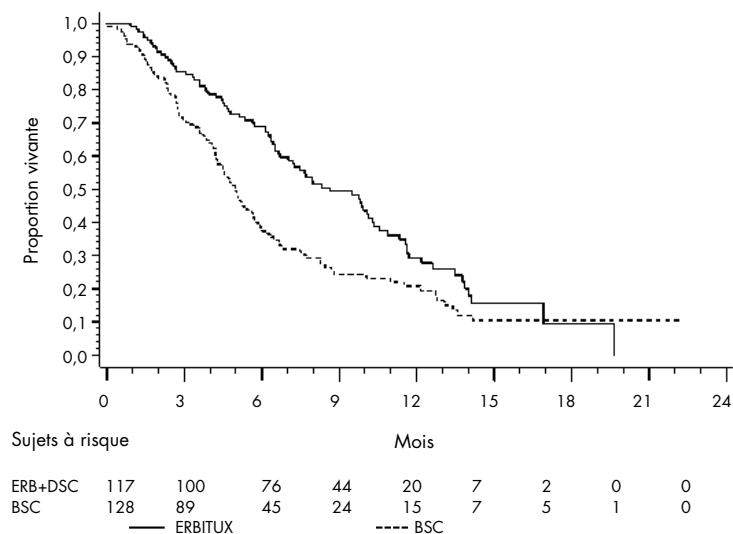


Figure 23. Courbe de Kaplan-Meier pour la survie globale chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique à mutation KRAS négative (type sauvage).

Les taux de survie globale fondés sur les estimations de Kaplan-Meier aux mois 6 et 12 étaient plus élevés pour le groupe Erbitux (cétuximab)+BSC que pour le groupe BSC pour le sous-groupe KRAS de type sauvage. Cet avantage n'a pas été observé dans le sous-groupe KRAS mutant.

Étude clinique étayant l'utilisation de Vectibix (panitumumab)

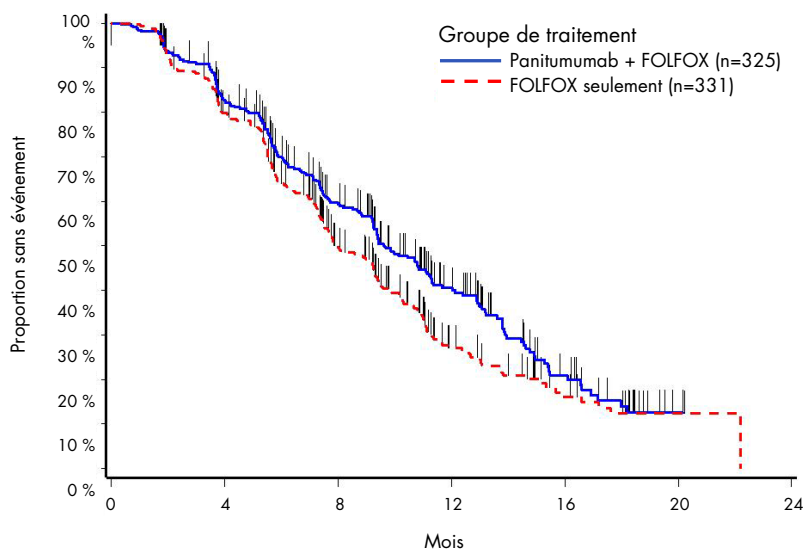
Une étude de performances cliniques a été réalisée afin de générer des données à l'appui de l'utilité clinique du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit comme outil de diagnostic permettant l'identification des patients pouvant bénéficier d'un traitement à base de Vectibix (panitumumab). L'objectif de l'étude était d'évaluer si le statut de mutation KRAS tel que déterminé par le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit peut être utilisé pour sélectionner les patients atteints de CCRm qui bénéficieraient d'un traitement au Vectibix (panitumumab). L'essai clinique 20050203 était une étude multicentrique, prospective, en ouvert, randomisée de phase 3 visant à évaluer l'efficacité du panitumumab en association avec l'oxaliplatine, le 5-fluorouracile (5-FU) et la leucovorine (FOLFOX) par rapport à la FOLFOX seule chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique (CCRm) récidivant non traité auparavant.

Des échantillons d'une banque de tumeurs provenant de patients de l'étude 20050203 ont été testés avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit afin d'identifier deux sous-groupes : positif à la mutation KRAS (KRAS mutant) et négatif à la mutation KRAS (KRAS de type sauvage), selon qu'au moins une ou aucune des 7 mutations de KRAS dans les codons 12 et 13 de l'exon 2 du gène KRAS a été détectée. Dans les analyses rétrospectives, les données d'efficacité de l'étude 20050203 ont été stratifiées par sous-groupe KRAS. L'objectif principal de l'analyse KRAS était d'évaluer si une amélioration globale de la SSP pour le Vectibix (panitumumab) plus FOLFOX par rapport à la FOLFOX seule était significativement plus importante chez les sujets atteints de tumeurs KRAS de type sauvage que chez les sujets atteints de tumeurs KRAS mutant.

Le critère primaire d'évaluation de l'efficacité préspecifié était la survie sans progression (SSP) chez le groupe de patients (n = 656) atteints de CCRm avec *KRAS* de type sauvage, telle qu'évaluée par un examen central indépendant en aveugle de l'imagerie clinique. Parmi les autres critères importants d'évaluation de l'efficacité figuraient la survie globale et le taux de réponse objectif (ORR). Les résultats d'efficacité chez les patients atteints de CCRm avec *KRAS* de type sauvage sont présentés au tableau 32 et à la figure 24.

Tableau 32. Résultats d'efficacité chez les patients atteints de CCRm avec *KRAS* de type sauvage

	Population de <i>KRAS</i> de type sauvage	Survie sans progression			
		Médiane (mois) (IC à 95 %)	Rapport de risque (IC à 95 %)	Valeur p	ORR (IC à 95 %)
Panitumumab plus FOLFOX	N = 325	9,6 (9,2, 11,1)	0,80 (0,66, 0,97)	0,02	54 % (48 %, 59 %)
FOLFOX seulement	N = 331	8,0 (7,5, 9,3)			47 % (41 %, 52 %)



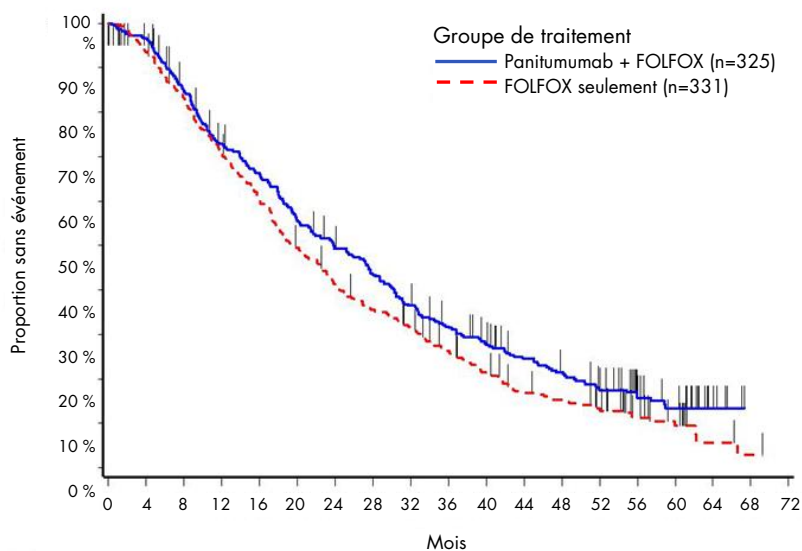
Sujets à risque

Panitumumab + FOLFOX	325	254	156	73	22	1	0
FOLFOX seulement	331	242	127	41	16	2	0

Figure 24. Graphique Kaplan-Meier de survie sans progression (SSP) chez les patients atteints de CCRm avec KRAS de type sauvage.

Chez les patients atteints de tumeurs avec *KRAS* mutant, la SSP médiane était de 7,3 mois (IC à 95 % : 6,3, 8,0) chez les 221 patients recevant du Vectibix (panitumumab) + FOLFOX par rapport à la SSP médiane de 8,8 mois (IC à 95 % : 7,7, 9,4) chez les 219 patients ayant reçu de la FOLFOX seule (RH = 1,29, IC à 95 % : 1,04 ; 1,62). La SG médiane était de 15,5 mois (IC à 95 % : 13,1, 17,6) chez les patients recevant du Vectibix (panitumumab) + FOLFOX par rapport à la SG médiane de 19,3 mois (IC à 95 % : 16,5, 21,8) chez les patients ayant reçu de la FOLFOX seule (RH = 1,24, IC à 95 % : 0,98 ; 1,57).

Une analyse exploratoire de la SG avec des informations mises à jour basées sur les événements relevés chez 82 % des patients atteints de CCRm avec *KRAS* de type sauvage a estimé l'effet du traitement au Vectibix (panitumumab) + FOLFOX par rapport à la FOLFOX seule. La valeur médiane de la SG chez 325 patients atteints de CCRm avec *KRAS* de type sauvage ayant reçu du Vectibix (panitumumab) + FOLFOX était de 23,8 mois (IC à 95 % : 20,0, 27,7) contre 19,4 mois (IC à 95 % : 17,4, 22,6) chez les 331 patients ayant reçu de la FOLFOX seule (RH = 0,83, IC à 95 % : 0,70 ; 0,98). Les résultats sont présentés dans la figure 25.



Sujets à risque

Panitumumab + FOLFOX	325	310	266	227	205	172	151	132	111	94	78	63	54	42	25	17	6	0	0
FOLFOX seulement	331	304	267	226	191	157	129	111	96	77	61	45	40	32	17	10	3	1	0

Figure 25. Graphique Kaplan-Meier de survie globale (SG) chez les patients atteints de CCRm avec *KRAS* de type sauvage.

Étude clinique étayant l'utilisation de LUMYKRAS® (sotorasib)

Une étude de performances cliniques a été réalisée afin de démontrer l'utilité clinique du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit comme outil de diagnostic permettant l'identification des patients atteints de CPNPC positif à la mutation *KRAS* G12C pouvant bénéficier d'un traitement à base de LUMYKRAS (sotorasib). L'objectif de l'étude était d'évaluer si le statut de mutation G12C tel que déterminé par le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit peut être utilisé pour sélectionner les patients atteints de CPNPC qui bénéficieraient d'un traitement au LUMYKRAS (sotorasib). L'essai clinique 20170543 était une étude en ouvert, multicentrique de phase 1/2, conçue pour évaluer l'efficacité et l'innocuité de LUMYKRAS (sotorasib) chez des sujets adultes présentant des tumeurs solides avancées présentant la mutation *KRAS* G12C.

Les données de l'analyse primaire de la partie CPNPC phase 2 de cette étude ont été utilisées pour étayer la validité clinique du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit comme outil de diagnostic.

L'inclusion dans l'étude a été limitée aux sujets atteints d'un CPNPC avec mutation *KRAS* G12C, tel qu'évalué par le résultat d'un laboratoire local, et confirmé par des tests centraux utilisant le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Le critère d'évaluation primaire de la partie CPNPC phase 2 de cette étude était d'évaluer le taux de réponse objectif (ORR) de la tumeur évalué par les critères d'évaluation de la réponse dans les tumeurs solides (RECIST), version 1,1, critères de LUMYKRAS (sotorasib) en monothérapie chez des sujets atteints de tumeurs avancées avec mutation *KRAS* G12C.

Sur un total de 126 sujets atteints de CPNPC, 124 sujets ont été inclus dans le groupe de l'analyse complète. Deux sujets ont été exclus, car ils ne présentaient pas ≥ 1 lésion mesurable selon la revue indépendante centralisée en aveugle (BICR).

Le critère d'évaluation principal de l'ORR (réponse complète + réponse partielle), mesurée par tomodensitométrie ou imagerie par résonance magnétique et évaluée selon RECIST 1.1 par le laboratoire BICR pour les sujets atteints de CPNPC avec mutation *KRAS* G12C, était de 37,1 % (46 sujets sur 124 ; IC à 95 % : 28,6-46,2 %) ; trois (3) sujets (2,4 %) ayant obtenu une réponse complète et 43 sujets (34,7 %) ayant obtenu une réponse partielle*.

* Sur la base des données au 1^{er} décembre 2020.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous permettre de résoudre les problèmes éventuels. Pour une assistance technique et plus d'informations, consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse www.qiagen.com/Support (pour nos coordonnées, visiter le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

Résultats non valides :

- | | |
|---|---|
| a) Les conditions de stockage pour au moins un composant ne respectaient pas les instructions données dans la section Prélèvement d'échantillons, préparation à l'analyse et stockage, page 17. | Vérifier les conditions de stockage et la date de péremption (voir l'étiquette) des réactifs et utiliser un nouveau kit si nécessaire. |
| b) Le <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit est périmé. | Vérifier les conditions de stockage et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et, si nécessaire, utiliser un nouveau <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit. |

Les échantillons NTC présentent des résultats positifs sur le canal FAM.

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

Indicateurs d'erreurs générés par le *therascreen* KRAS Assay Package

Le tableau 33 liste les indicateurs d'erreurs pouvant être générés par le *therascreen* KRAS Assay Package, ainsi que leur signification et les actions à effectuer. Les indicateurs sont pertinents pour le CPNPC et le CCR.

Tableau 33. Signification des indicateurs d'erreurs du Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package et actions recommandées

Indicateur	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_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 repasser le ou les échantillons concernés.

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 32. Signification des indicateurs d'erreurs du Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package et actions recommandées

Indicateur	Signification	Action
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 de PCR pour répéter l'échantillon.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Échantillon non valide : C _T FAM trop élevé dans la réaction du contrôle d'échantillon	Configurer une nouvelle analyse PCR pour repasser l'échantillon. S'il demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR, extraire l'échantillon à partir d'une ou plusieurs coupes FFPE supplémentaires (≥4 coupes). Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est non valide, répéter cette 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.

Indicateurs spécifiques au CPNPC

Le tableau 34 répertorie les indicateurs pouvant être générés par le logiciel Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package, leur signification et les actions à entreprendre pour les échantillons de CPNPC.

Tableau 34. Signification des indicateurs d'erreurs du Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package et actions recommandées pour les échantillons de CPNPC

Indicateur	Signification	Action
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	Configurer une nouvelle analyse PCR pour repasser l'échantillon. S'il demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR, extraire l'échantillon à partir d'une ou plusieurs coupes FFPE supplémentaires. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est non valide, répéter cette 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_EARLY_CT	Tube de mutation non valide : C _T HEX trop faible pour l'échantillon (contrôle interne)	Configurer une nouvelle analyse PCR pour repasser l'échantillon. S'il demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR, extraire l'échantillon à partir d'une ou plusieurs coupes FFPE supplémentaires. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est non valide, répéter cette 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.

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 34. Signification des indicateurs d'erreurs du Rotor-Gene Q thetascreen KRAS Assay Package et actions recommandées pour les échantillons de CPNPC

Indicateur	Signification	Action
SAMPLE_INVALID_DATA	Tube de mutation non valide : impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle interne	Configurer une nouvelle analyse PCR pour repasser l'échantillon. S'il demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR, extraire l'échantillon à partir d'une ou plusieurs coupes FFPE supplémentaires. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est non valide, répéter cette 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.
MUTATION_EARLY_CT	Tube de mutation : C _T FAM trop faible pour l'échantillon.	Configurer une nouvelle analyse PCR pour repasser l'échantillon. S'il demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR, extraire l'échantillon à partir d'une ou plusieurs coupes FFPE supplémentaires. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est non valide, répéter cette 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_POSITIVE_AND_INVALID	L'échantillon est positif à au moins une mutation avec un résultat valide ; en même temps, le résultat du même échantillon est non valide pour au moins une mutation (message d'avertissement, mais pas de message d'erreur)	Configurer une nouvelle analyse PCR pour repasser l'échantillon. S'il demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR, extraire l'échantillon à partir d'une ou plusieurs coupes FFPE supplémentaires. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est non valide, répéter cette 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.

Indicateurs spécifiques au CCR

Le tableau ci-dessous répertorie les indicateurs pouvant être générés par le logiciel Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package, leur signification et les actions à entreprendre pour les échantillons de CCR.

Tableau 35. Signification des indicateurs d'erreurs du Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package et actions recommandées pour les échantillons de CCR

Indicateur	Signification	Action
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>Si l'échantillon est désigné comme valide : aucune action.</p> <p>Si l'échantillon est désigné comme non valide, configurer une nouvelle analyse PCR pour repasser l'échantillon. S'il demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR, extraire l'échantillon à partir d'une ou plusieurs coupes FFPE supplémentaires. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est non valide, répéter cette 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_INT_CTRL_EARLY_CT	Tube de mutation non valide : C_T HEX trop faible pour l'échantillon (contrôle interne)	<p>Si l'échantillon est désigné comme valide : aucune action.</p> <p>Si l'échantillon est désigné comme non valide, configurer une nouvelle analyse PCR pour repasser l'échantillon. S'il demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR, extraire l'échantillon à partir d'une ou plusieurs coupes FFPE supplémentaires. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est non valide, répéter cette 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>

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Tableau 35. Signification des indicateurs d'erreurs du Rotor-Gene Q thetascreen KRAS Assay Package et actions recommandées pour les échantillons de CCR (suite)

Indicateur	Signification	Action
SAMPLE_INVALID_DATA	Tube de mutation non valide : impossible d'interpréter les données de fluorescence dans le contrôle interne	Si l'échantillon est désigné comme valide : aucune action. Si l'échantillon est désigné comme non valide, configurer une nouvelle analyse PCR pour repasser l'échantillon. S'il demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR, extraire l'échantillon à partir d'une ou plusieurs coupes FFPE supplémentaires. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est non valide, répéter cette 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.
MUTATION_EARLY_CT	Tube de mutation : C _T FAM trop faible pour l'échantillon.	Si l'échantillon est désigné comme valide : aucune action. Si l'échantillon est désigné comme non valide, configurer une nouvelle analyse PCR pour repasser l'échantillon. S'il demeure non valide lors du nouveau cycle de PCR, extraire l'échantillon à partir d'une ou plusieurs coupes FFPE supplémentaires. Configurer une nouvelle analyse PCR pour tester la nouvelle extraction. Si le résultat est non valide, répéter cette 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_POSITIVE_AND_INVALID	L'échantillon est positif à au moins une mutation avec un résultat valide ; en même temps, le résultat du même échantillon est non valide pour au moins une mutation (message d'avertissement, mais pas de message d'erreur)	Aucune.

Contrôle de la qualité

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

Références

Références citées

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

Références utiles

- Amado, R.G. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1626.
- Benvenuti, S. et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* **67**, 2643.
- Bokemeyer, C. et al., (2008) K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl; abstr 4000).

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

-
- Khambata-Ford, S. et al. (2007) Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3230.
 - Lièvre A. et al. (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **26**, 374.
 - Lievre, A. et al. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 3992.
 - Reckamp, K.L. et al. (2014) A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. *Cancer.* 120, 1145.
 - Tejpar, S. et al. (2008) Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J. Clin. Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 4001).
 - Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.
 - Van Cutsem, E. et al. (2008) K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 2).

Symboles

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



Symbole de conformité européenne



<N>

Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions



À utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic in vitro



N° de réf.



Numéro de lot



Référence produit



Contient



Numéro

Rn

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



Limite de température



Fabricant



Consulter le mode d'emploi



Attention

Coordonnées

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

Annexe 1 : protocole manuel du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit

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

Informations générales

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

Protocole : création d'un profil de température

Avant de commencer, créer un profil de température pour l'analyse KRAS. Les paramètres de cycle sont les mêmes pour l'évaluation des échantillons et l'évaluation des mutations.

Procédure

Les paramètres des cycles sont indiqués dans le tableau 36.

Tableau 36. Paramètres des cycles

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 version 2.3 sur le bureau de l'ordinateur portable connecté à l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Sélectionner l'onglet « Advanced » (Avancé) dans la fenêtre « New Run » (Nouveau cycle) qui s'affiche.

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 26).

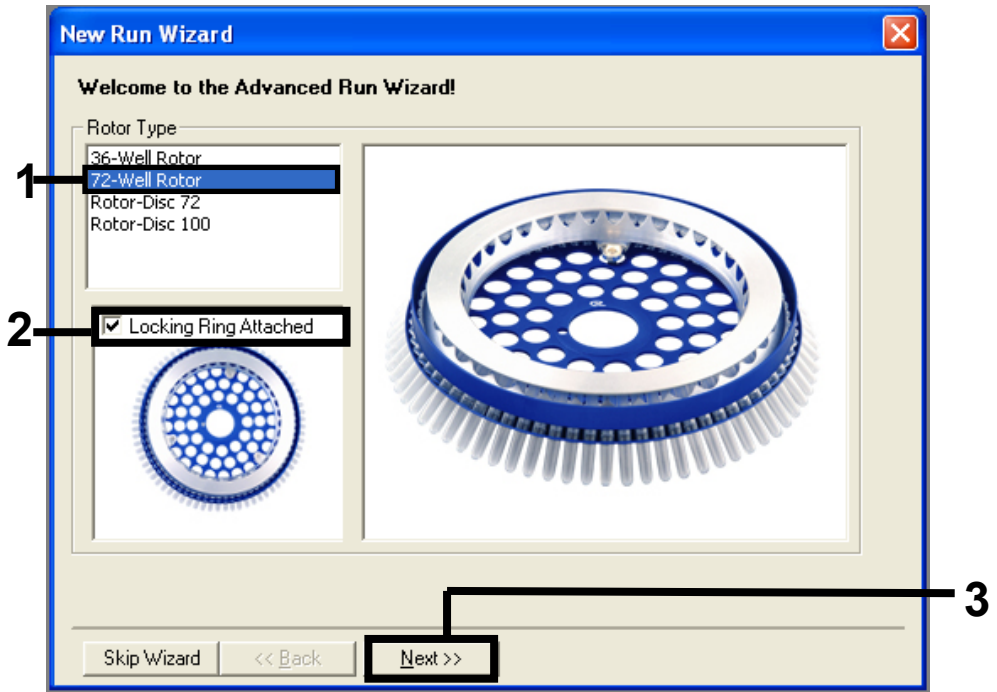


Figure 26. Boîte de dialogue New Run Wizard (Assistant Nouveau cycle). 1 = « Rotor type » (Type de rotor), 2 = case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage fixée), 3 = « Next » (Suivant).

4. Entrer le nom de l'opérateur. Ajouter toutes remarques éventuelles et entrer 25 comme valeur de volume réactionnel. Vérifier que le champ Sample Layout (Répartition des échantillons) affiche 1, 2, 3.... Cliquer sur Next (Suivant) (figure 27).

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 : NAME

Notes :

Reaction Volume (µL): 25

Sample Layout : 1, 2, 3...

Skip Wizard << Back Next >>

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

Figure 27. Saisie du nom de l'opérateur et des volumes réactionnels. 1 = champ « Operator » (Opérateur), 2 = champ « Notes », 3 = champ « Reaction Volume » (Volume réactionnel), 4 = champ « Sample Layout » (Répartition des échantillons), 5 = « Next » (Suivant).

5. Cliquer sur Edit Profile (Modifier le profil) dans la fenêtre New Run Wizard (Assistant nouveau cycle) (figure 28), puis programmer le profil de température comme indiqué dans les étapes suivantes.

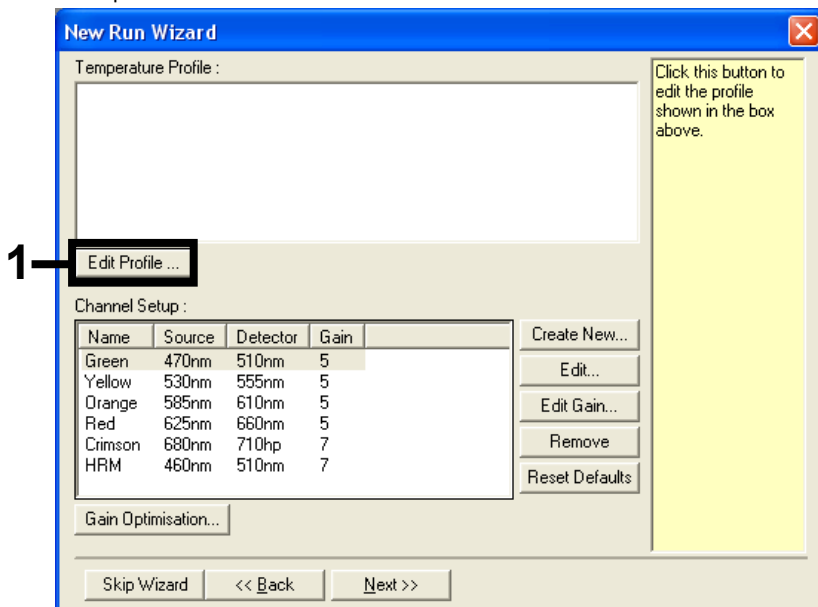


Figure 28. Modification du profil.

6. Cliquer sur Insert after (Insérer après) puis sélectionner New Hold at Temperature (Nouveau palier de température) (figure 29).

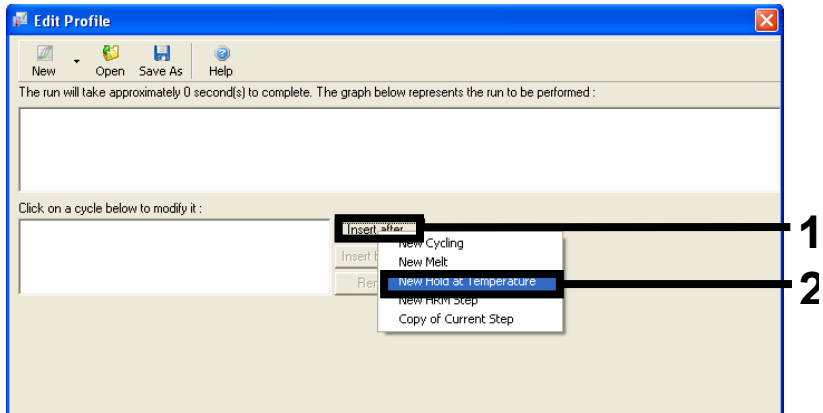


Figure 29. Insertion d'une étape d'incubation initiale. 1 = « Insert after » (Insérer après), 2 = « New Hold at Temperature » (Nouveau palier de température).

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 30).

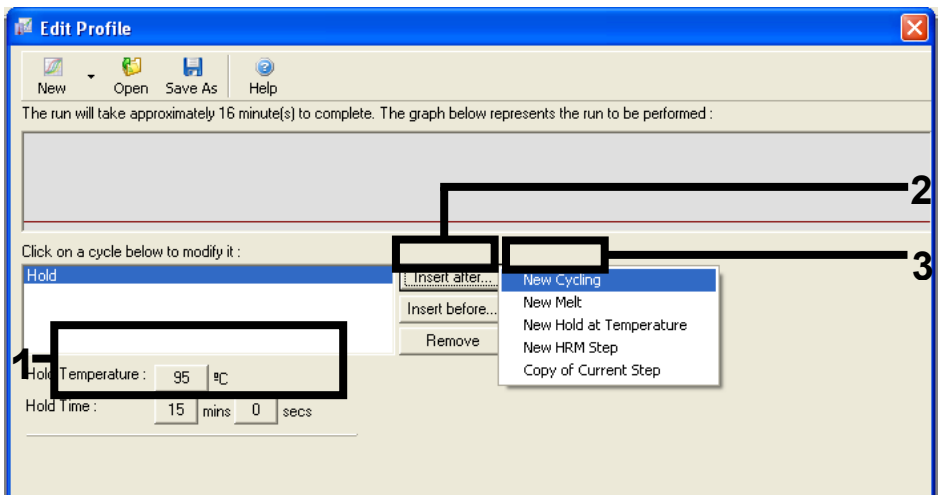


Figure 30. Étape d'incubation initiale à 95 °C. 1 = « Hold Temperature » (Température du palier) et « Hold Time » (Durée du palier), 2 = « Insert after » (Insérer après), 3 = « New Cycling » (Nouveau cycle).

8. Attribuer au nombre de répétitions de cycles une valeur de 40. Sélectionner la première étape et la définir sur 95°C for 30 secs (95 °C pendant 30 secondes) (figure 31).

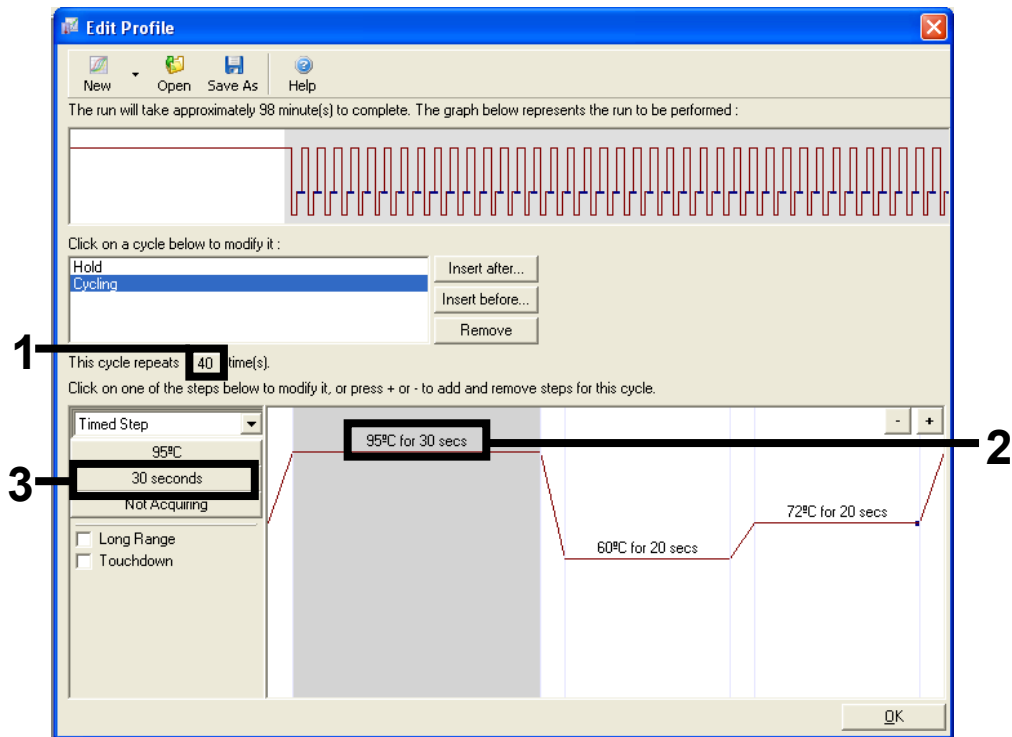


Figure 31. Étape de cycle à 95 °C. 1 = case « Cycle repeats » (Nombre de répétitions du cycle), 2 = réglage de la température pour l'étape 1, 3 = réglage de la durée pour l'étape 1.

9. Mettre la deuxième étape en surbrillance et la définir sur 60°C pour 60 secs (60 °C pendant 60 secondes). Activer l'acquisition des données pendant cette étape en cliquant sur Not Acquiring (Pas d'acquisition) (figure 32).

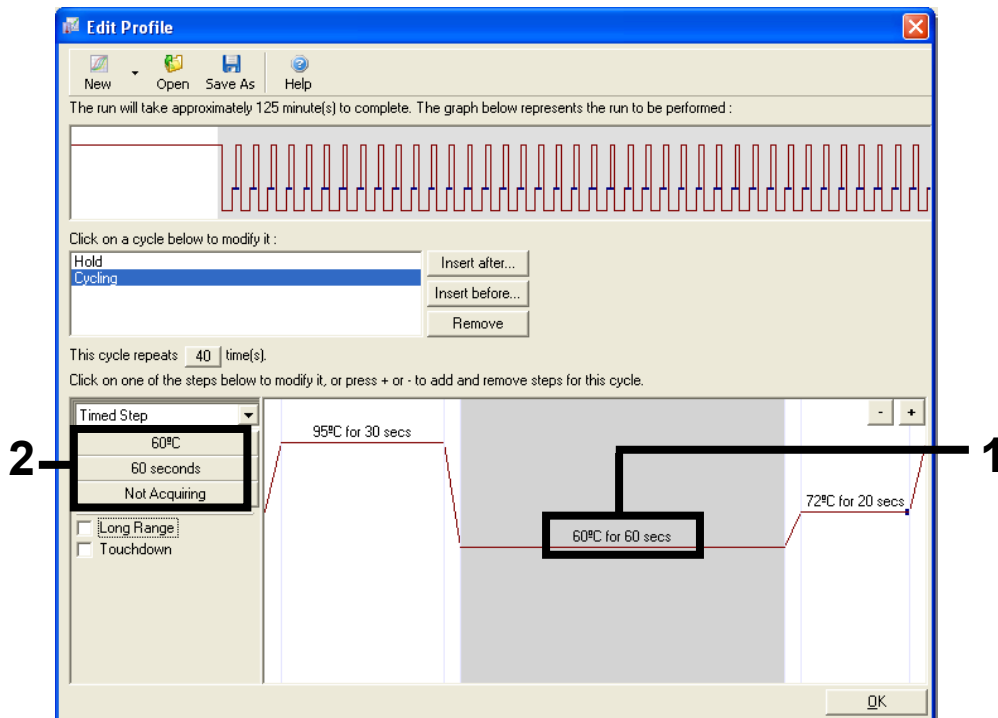


Figure 32. Étape de cycle à 60 °C. 1 = réglage de la température et de la durée pour l'étape 2, 2 = « Not Acquiring » (Pas d'acquisition).

10. Dans la liste « Available Channels » (Canaux disponibles), sélectionner les canaux Green et Yellow puis cliquer sur > pour les transférer dans la liste « Acquiring Channels » (Canaux d'acquisition). Cliquer sur OK (figure 33).

Acquisition

Same as Previous : (New Acquisition)

Acquisition Configuration :

Available Channels :

Name
Crimson
HRM
Orange
Red

Acquiring Channels :

Name
Green
Yellow

To acquire from a channel, select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a channel, select it in the right-hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<.

Dye Chart >> OK Don't Acquire Help

Dye Channel Selection Chart

Channel	Source	Detector	Dyes
Green	470nm	510nm	FAM [®] , SYBR Green 1 [®] , Fluorescein, EvaGreen [®] , Alexa Fluor 488 [®]
Yellow	530nm	555nm	JOE [®] , VIC [®] , HEX, TET [®] , CAL Fluor Gold 540 [®] , Yakima Yellow [®]
Orange	585nm	610nm	ROX [®] , CAL Fluor Red 610 [®] , Cy3.5 [®] , Texas Red [®] , Alexa Fluor 568 [®]
Red	625nm	660nm	Cy5 [®] , Quasar 670 [®] , Alexa Fluor 633 [®]
Crimson	680nm	710hp	Quasar705 [®] , Alexa Fluor 680 [®]
HRM	460nm	510nm	SYTO 9 [®] , EvaGreen [®]

Figure 33. Acquisition à l'étape de cycle à 60 °C.

11. Mettre la troisième étape en surbrillance et cliquer sur – pour la supprimer. Cliquer sur OK (figure 34).

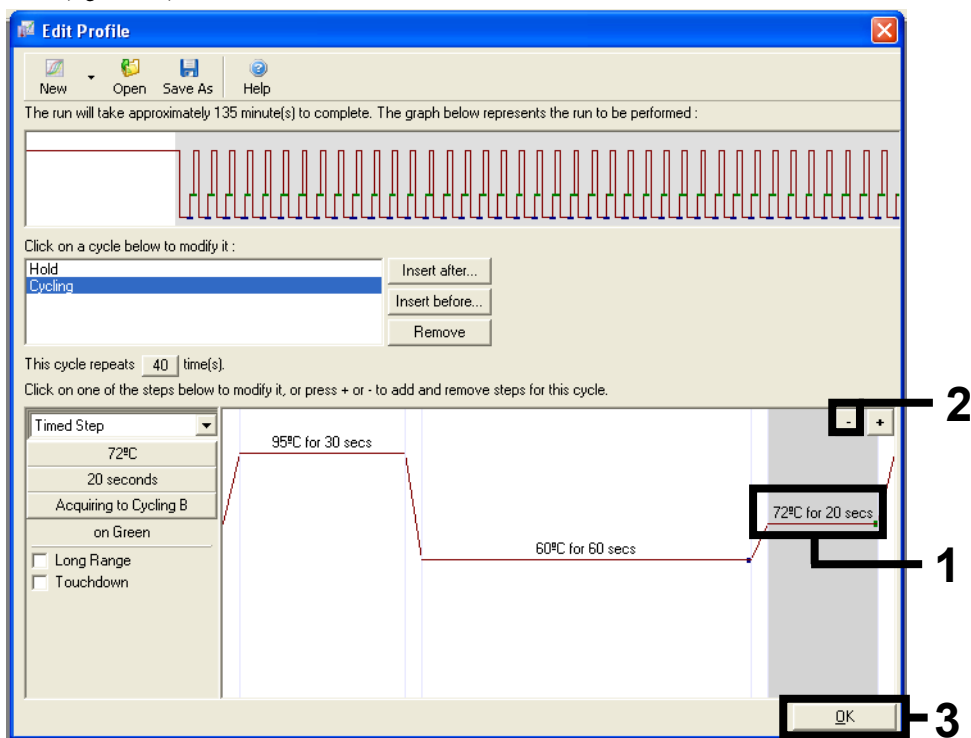


Figure 34. Suppression de l'étape d'élongation.

12. Dans la fenêtre suivante, cliquer sur Gain Optimization (Optimisation du gain) (figure 35).

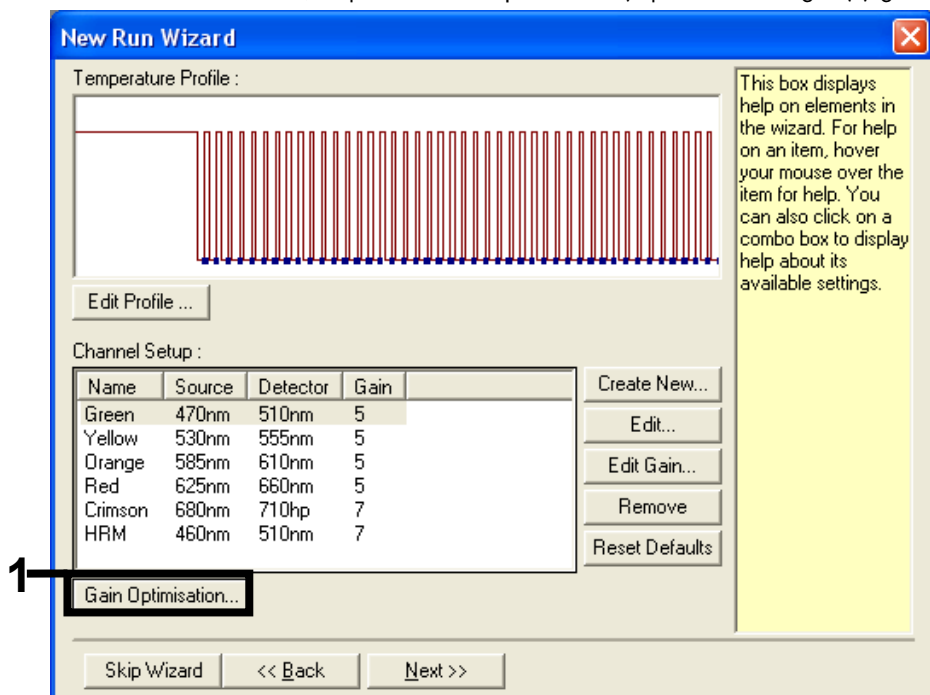


Figure 35. Gain Optimization (Optimisation du gain).

13. Cliquer sur Optimize Acquiring (Optimiser l'acquisition). Les paramètres de chaque canal sont affichés. Cliquer sur OK pour accepter ces valeurs par défaut. (Figure 36).

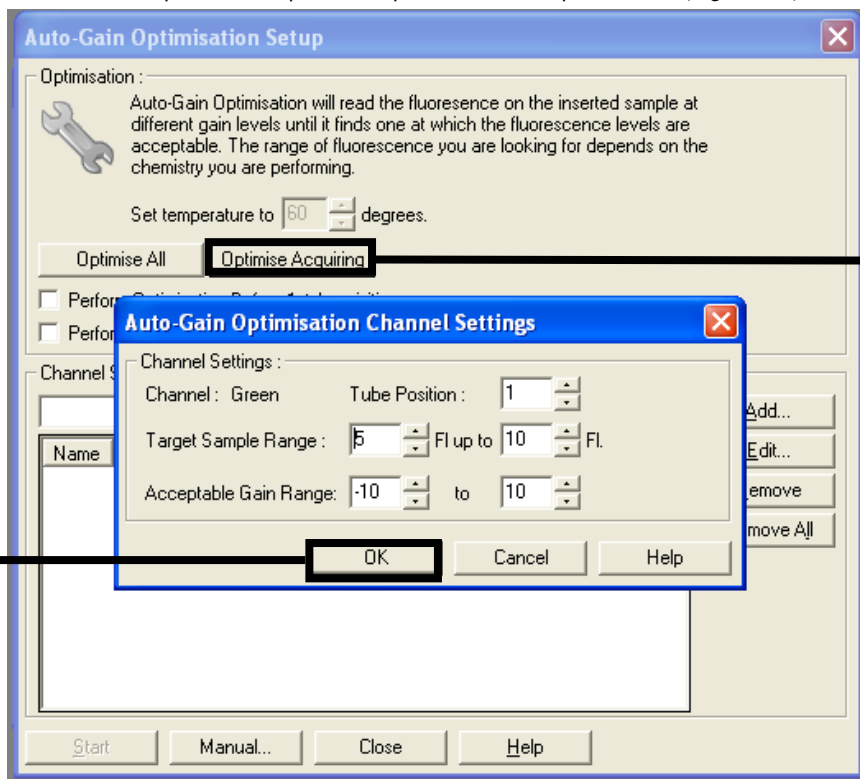


Figure 36. Auto-gain Optimization (Optimisation du gain automatique) pour le canal vert.

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 37).

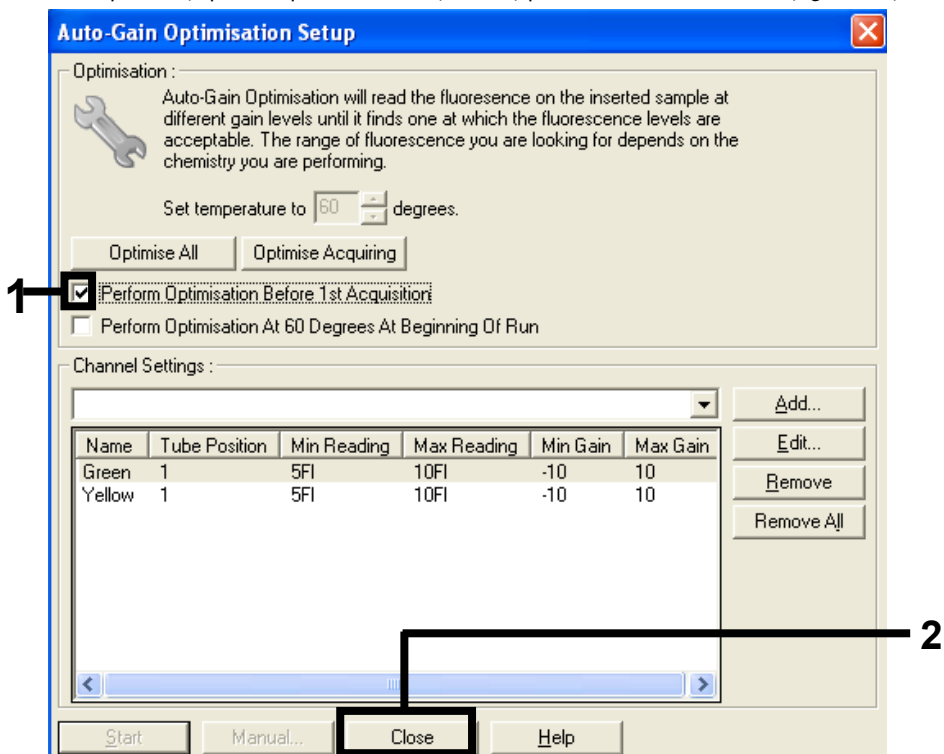


Figure 37. Sélection des canaux vert et jaune.

15. Cliquer sur Next (Suivant). Cliquer ensuite sur Save (Enregistrer) pour enregistrer le modèle dans un emplacement approprié.

Protocole : évaluation (manuelle) des échantillons

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

- Préparer les échantillons comme décrit dans la section « Protocole : évaluation des échantillons d'ADN ».
- Configurer le cycle de PCR sur l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM5plex HRM comme décrit dans la section « Protocole : configuration de *therascreen* KRAS RQG PCR ».
- Une fois le cycle terminé, analyser les données conformément aux instructions de la section « Analyse des données d'évaluation de l'échantillon ».

Protocole : détection (manuelle) des mutations KRAS

Une fois que l'évaluation d'un échantillon s'avère satisfaisante, celui-ci peut subir les tests de détection des mutations KRAS.

- Préparer les échantillons comme décrit dans la section « Protocole : évaluation des échantillons d'ADN ».
- Configurer le cycle de PCR sur l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM5plex HRM comme décrit dans la section « Protocole : configuration de *therascreen* KRAS RQG PCR ».
- Une fois le cycle terminé, analyser les données conformément aux instructions de la section « Analyse des données d'évaluation de l'échantillon ».

Protocole : configuration de *therascreen* KRAS RQG PCR

1. Ouvrir le logiciel Rotor-Gene Q version 2.3 et le profil de température créé approprié.
2. Créer le profil de température conformément à la section « Protocole : création d'un profil de température ».

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 38).

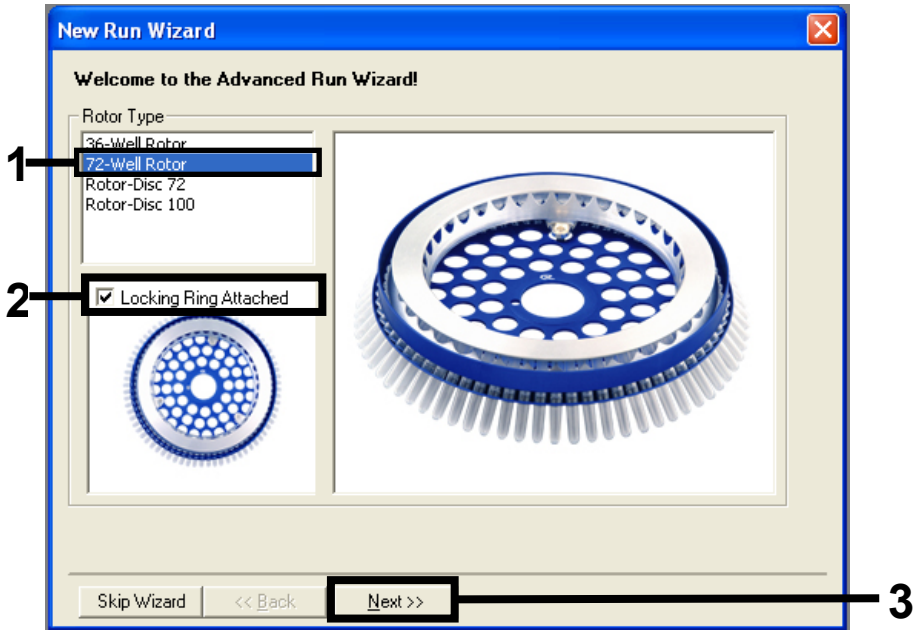


Figure 38. Boîte de dialogue New Run Wizard (Assistant nouveau cycle) et écran d'accueil. 1 = « Rotor type » (Type de rotor), 2 = case « Locking Ring Attached » (Bague de verrouillage fixée), 3 = « Next » (Suivant).

3. Entrer le nom de l'opérateur. Ajouter toutes notes éventuelles, vérifier que le Reaction volume (Volume réactionnel) est fixé à 25 et que le champ Sample Layout (Répartition des échantillons) affiche 1, 2, 3.... Cliquer sur Next (Suivant) (figure 39).

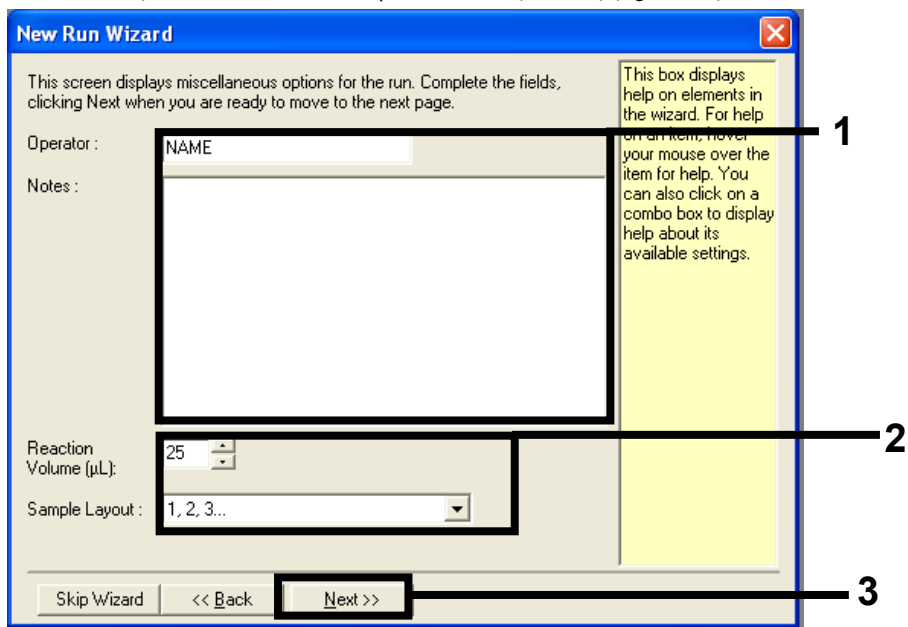


Figure 39. Boîte de dialogue New Run Wizard (Assistant Nouveau cycle). 1 = champs « Operator » (Opérateur) et « Notes », 2 = champs « Reaction Volume » (Volume réactionnel) et « Sample Layout » (Répartition des échantillons), 3 = « Next » (Suivant).

4. Laisser toutes les valeurs inchangées dans la prochaine fenêtre. Aucune modification n'est nécessaire, car le profil a été créé conformément aux instructions dans la section « Protocole : création d'un profil de température ». Cliquer sur Next (Suivant) (figure 40).

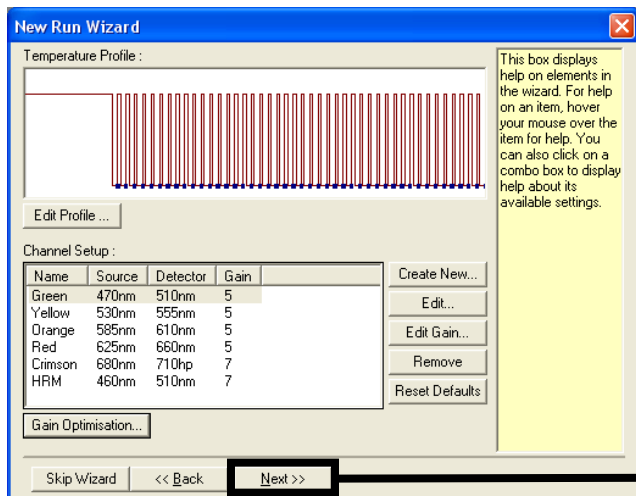


Figure 40. Boîte de dialogue New Run Wizard (Assistant nouveau cycle) et écran de modification de la température. 1 = « Next » (Suivant).

5. Vérifier le résumé puis cliquer sur Start Run (Démarrer le cycle) pour enregistrer le fichier de cycle et lancer le cycle (figure 41).

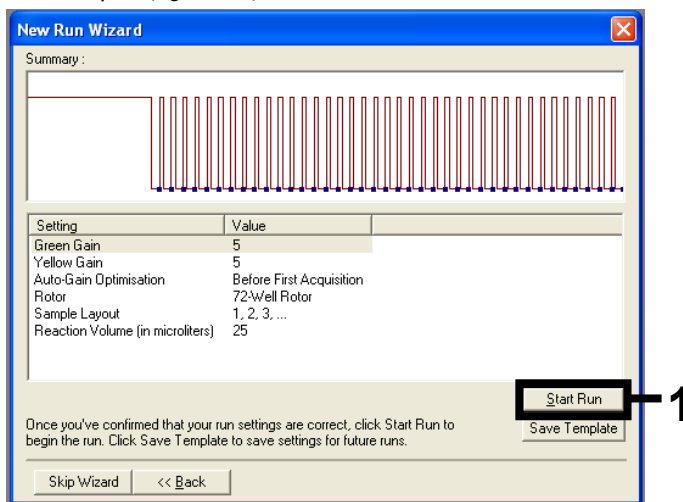


Figure 41. Boîte de dialogue New Run Wizard (Assistant Nouveau cycle). 1 = Start Run (Démarrer le cycle).

Remarque : une fois le cycle lancé, une nouvelle fenêtre s’ouvre. Elle permet de saisir le nom des échantillons immédiatement ou de cliquer sur Finish (Terminer) pour les saisir ultérieurement en sélectionnant le bouton Sample (Échantillon) pendant le cycle ou après son achèvement.

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 le bon déroulement des tests et de l’analyse.

Remarque : lors de l’attribution des noms, les puits vides doivent être laissés vierges dans la colonne Name (Nom).

6. Une fois l’analyse terminée, analyser les données conformément aux sections Analyse des données d’évaluation des échantillons ou Analyse de la détection des mutations KRAS, selon le cas.
7. 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.

Annexe 2 : installation du *therascreen* KRAS Assay Package

Le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit est conçu pour une utilisation avec le Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM et un rotor à 72 puits. Le *therascreen* KRAS Assay Package est disponible séparément sur CD (N° de réf. 9023675).

Le *therascreen* KRAS Assay Package est disponible au téléchargement sur la page Web du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sur www.qiagen.com. Les informations de téléchargement se trouvent dans la section « Product Resources » (Ressources produit) sous l'onglet « Supplementary Protocols » (Protocoles supplémentaires). Les Assay Packages peuvent également être commandés sur CD.

Le package inclut les modèles « *therascreen* KRAS CE QC Locked Template » et « *therascreen* KRAS CE Locked Template ».

Remarque : le *therascreen* KRAS Assay Package fonctionne uniquement avec le logiciel Rotor-Gene Q version 2.3 correspondant au *therascreen* KRAS Assay Package version 3.0.3 (QIAGEN, N° de réf. 9023675). Vérifier que la bonne version du logiciel Rotor-Gene Q est installée avant de procéder à l'installation du *therascreen* KRAS Assay Package.

Procédure (téléchargement)

1. Télécharger le *therascreen* KRAS RGQ Assay Package sur la page Web du *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit à l'adresse www.qiagen.com.
2. Double-cliquer sur le fichier et l'extraire dans l'archive.
3. Double-cliquer sur `therascreen_KRAS_Assay_Package_3.0.3.exe` pour démarrer l'installation.

Procédure (CD)

1. Commander le CD du *therascreen* KRAS RGQ Assay Package CE compatible avec le logiciel Rotor-Gene Q installé (voir plus haut), qui est disponible séparément auprès de QIAGEN.

Version 3.0.3. N° de réf. 9023675.

2. Insérer le CD dans le lecteur CD de l'ordinateur portable connecté à l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
3. Double-cliquer sur *therascreen_KRAS_Assay_Package_3.0.3.exe* ou *therascreen_KRAS_Assay_Package_1.0.12.exe* pour démarrer l'installation. L'assistant d'installation s'ouvre.
4. Cliquer sur Next (Suivant) pour continuer (figure 42).

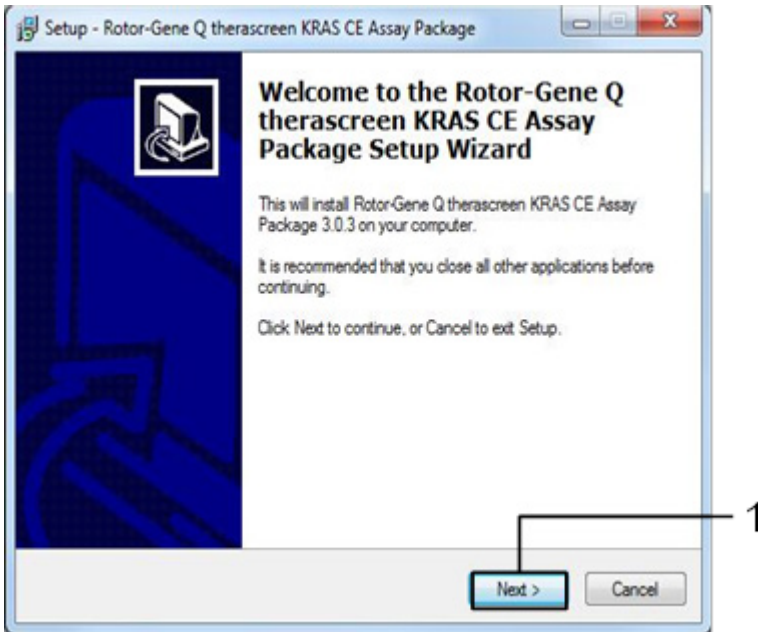


Figure 42. Boîte de dialogue Setup (Installation). 1 = « Next » (Suivant).

5. Lire le Contrat de licence dans la boîte de dialogue License Agreement (Contrat de licence) et cocher la case « I accept the agreement » (J'accepte le contrat). Cliquer sur Next (Suivant) pour continuer (figure 43).

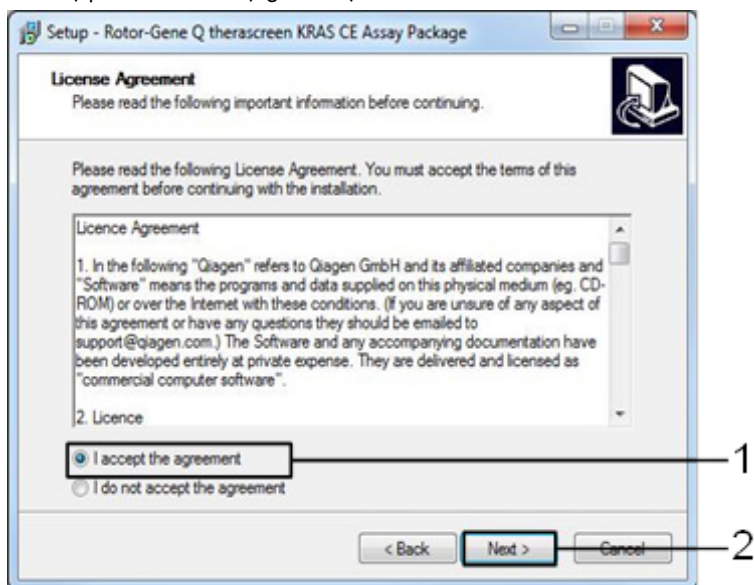


Figure 43. Boîte de dialogue License Agreement (Contrat de licence). 1 = « I accept the agreement » (J'accepte le contrat), 2 = « Next » (Suivant).

L'installation du modèle se lance automatiquement.

6. Dans la dernière fenêtre d'installation, cliquer sur Finish (Terminer) pour quitter l'assistant d'installation. (Figure 44).

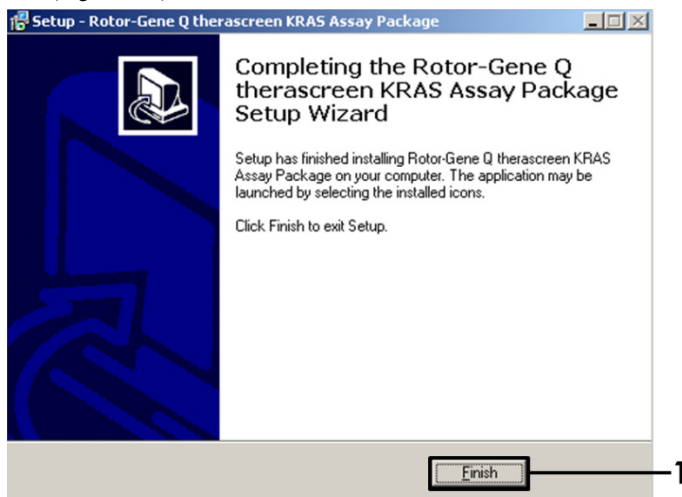


Figure 44. Fermeture de l'assistant d'installation.

7. Redémarrer l'ordinateur. Les raccourcis des modèles « *therascreen* KRAS QC Locked Template » (Modèle verrouillé du *therascreen* KRAS QC) et « *therascreen* KRAS Locked Template » (Modèle verrouillé du *therascreen* KRAS) sont générés automatiquement et s'affichent sur le bureau.

Informations pour commander

Produit	Sommaire	N° de réf.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	Pour 24 réactions : 1 dosage de contrôle, 7 dosages de mutations, contrôle positif, eau, Taq ADN polymérase	874011
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (version 3.0.3)	Package de protocole logiciel conçu pour une utilisation avec le <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit et l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM de QIAGEN avec un rotor à 72 puits.	9023675
Rotor-Gene Q et accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	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
Rotor-Gene Q MDx	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	Sommaire	N° de réf.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloc en aluminium pour préparation manuelle des réactions à l'aide d'une pipette monocanal dans 72 tubes de 0,1 ml.	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 barrettes de 4 tubes et bouchons pour 1 000 réactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 barrettes de 4 tubes et bouchons pour 10 000 réactions	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, pour la purification d'ADN génomique de tissus inclus en paraffine		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pour 50 préparations d'ADN : colonnes QIAamp MinElute®, protéinase K, tampons et tubes de prélèvement (2 ml)	56404

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

Historique des révisions du document

Date	Changements
R4, janvier 2019	<p>Ajout du représentant agréé (première de couverture)</p> <p>Réactualisation de la section « Symboles »</p> <p>Réactualisation du modèle</p>
R5, novembre 2019	<p>Modification du fabricant légal (première de couverture)</p> <p>Suppression du symbole EC + REP sur la première de couverture et dans la section « Symboles »</p> <p>Adaptation du nom de l'appareil Rotor-Gene Q MDx en Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM pour le faire correspondre à l'étiquette sur l'appareil</p> <p>Réactualisation du protocole de détection des mutations KRAS pour inclure l'étape supplémentaire dans la préparation des mélanges principaux</p> <p>Correction des valeurs dans les colonnes « Fréquence » et « Intervalle de confiance à 95 % » dans le tableau 10.</p> <p>Réactualisation de 96,4 % à 96,82 % de la concordance globale des CCR.</p> <p>Correction des valeurs dans la colonne « LOD C_{95} » du tableau 15</p>
R6, novembre 2020	<p>Correction de la version du theascreen KRAS Assay Package en 3.0.3</p> <p>Mise à jour complète de ce document concernant la disponibilité au téléchargement d'Assay Package sur le site www.qiagen.com</p> <p>Ajout d'une note tout au long du document concernant les actions liées aux indicateurs pour l'indication CPNPC mise à jour pour assurer le bon fonctionnement du kit</p> <p>Ajout d'une note tout au long des procédures de ce document sur le bon mélange des réactifs</p> <p>Mise à jour de la section Précautions générales</p> <p>Ajout d'une note pour le positionnement correct de l'appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM</p> <p>Ajout d'une note concernant l'utilisation de scalpels secs</p> <p>Mise à jour du protocole : Évaluation des échantillons d'ADN pour ajouter des points importants supplémentaires avant de commencer</p> <p>Mise à jour de la section Protocole : détection des mutations KRAS pour ajouter des points importants supplémentaires avant de commencer et une note pour les échantillons de CPNPC afin d'interpréter plusieurs indicateurs comme non valides</p> <p>Mise à jour de la section relative aux indicateurs du Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package pour ajouter des tableaux illustrant les indicateurs RGQ, leur signification et les actions recommandées</p> <p>Mise à jour de l'interprétation des résultats concernant les actions liées aux indicateurs.</p> <p>Mise à jour de la section Guide de dépannage pour ajouter des tableaux illustrant les indicateurs RGQ, leur signification et les actions recommandées</p> <p>Mise à jour de la section Limitations pour ajouter des informations sur les échantillons de CPNPC</p>

Date	Changements
	Révision de la section Caractéristiques des performances pour mettre à jour les données des tableaux
	Mise à jour de la section Quantité d'ADN introduit et linéarité
	Mise à jour de la section Répétabilité et reproductibilité
	Mise à jour de la section Variabilité dans la manipulation des échantillons
	Ajout de la section Performances cliniques
	Mise à jour de la section Analyse des données d'évaluation de l'échantillon pour réviser la solution recommandée pour le dosage de contrôle d'échantillon CT de > 32
	Ajout du marquage de conformité européenne à la section Symboles
	Mise à jour de la section Interprétation (manuelle) des résultats concernant les actions liées aux indicateurs.
	Mise à jour de la section Protocole : détection des mutations KRAS pour inclure des étapes sur la préparation des mélanges principaux

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Contrat de licence limitée pour le *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR Kit

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

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

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

Les noms déposés, 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.

Ne pas utiliser avec des échantillons de selles.

Ne pas utiliser avec des échantillons d'urine.

Ne pas utiliser avec de l'acide nucléique extracellulaire provenant d'un échantillon sanguin.

Ne pas utiliser avec des échantillons de moelle osseuse acellulaire.

Ne pas utiliser avec des échantillons de salive.

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

1127513FR HB-1861-006 04-2022 © 2022 QIAGEN, tous droits réservés.

