

Mars 2022

# Mode d'emploi du *therascreen*<sup>®</sup> EGFR Plus RGQ PCR Kit



Version 1



Pour utilisation diagnostique in vitro

À utiliser avec du plasma ou des tissus FFIP

À utiliser avec l'instrument Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM et avec Rotor-Gene<sup>®</sup> AssayManager<sup>®</sup>



874611



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724  
Hilden, ALLEMAGNE



1126175FR



# Table des matières

Utilisation prévue .....	6
Indication d'emploi .....	6
Description et principe .....	7
Résumé et explications .....	7
Principe de la procédure .....	10
Technologie .....	12
Matériel fourni .....	16
Contenu du kit .....	16
Format du kit et dosages .....	17
Plate-forme et logiciel .....	19
Matériel nécessaire, mais non fourni .....	20
Réactifs supplémentaires pour la préparation des échantillons .....	20
Consommables et équipement général de laboratoire .....	20
Équipement .....	21
Avertissements et précautions .....	23
Informations de sécurité .....	23
Précautions .....	23
Conservation et manipulation des réactifs .....	26
Conditions d'expédition .....	26
Conditions de conservation .....	26
Stabilité .....	27
Conservation et manipulation des échantillons .....	28

Échantillons FFIP .....	28
Échantillons de plasma.....	29
Échantillons d'ADN génomique et d'ADN libre circulant.....	29
Procédure .....	30
Protocole : extraction et préparation de l'ADN.....	30
Protocole : extraction d'ADNg à partir d'échantillons FFIP.....	30
Protocole : extraction automatisée d'ADNg à partir d'échantillons FFIP à l'aide du QIAsymphony SP .....	32
Protocole : extraction manuelle d'ADNg à partir d'échantillons FFIP .....	32
Protocole : déparaffinage d'une section FFIP avec la QIAGEN Deparaffinization Solution.....	33
Protocole : protocole de prétraitement à utiliser avec le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.....	36
Protocole : extraction d'ADNlc à partir d'échantillons de plasma .....	39
Protocole : extraction automatisée d'ADNlc à partir d'échantillons de plasma à l'aide du QIAsymphony SP.....	40
Protocole : extraction manuelle d'ADNlc à partir d'échantillons de plasma.....	40
Protocole : quantification et normalisation de l'ADNg.....	41
Protocole : évaluation des mutations de l' <i>EGFR</i> par qPCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM.....	43
Protocole : préparation de l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.....	47
Interprétation des résultats [le cas échéant] .....	61
Contrôles.....	61
Échantillons .....	62
Indicateurs.....	64

Nouveaux tests .....	67
Limitations.....	70
Caractéristiques de performances.....	72
Limite du blanc.....	72
Limite de détection.....	73
Quantité d'ADN.....	75
Répétabilité .....	76
Reproductibilité .....	79
Substances interférentes .....	82
Spécificité et réactivité croisée .....	85
Contamination croisée et transfert .....	85
Durée d'utilisation .....	86
Performances cliniques .....	87
Références .....	95
Guide de dépannage.....	97
Contrôle qualité.....	103
Symboles.....	104
Coordonnées .....	105
Annexe A : installation du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 et du plug-in Gamma, et importation du profil du dosage .....	106
Annexe B : exécution des profils du dosage FFIP et plasma dans la même expérience ....	110
Informations de commande .....	113
Historique des révisions du document.....	116

---

## Utilisation prévue

Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit est un test real-time PCR de diagnostic *in vitro* permettant la détection qualitative et l'identification des mutations des exons 18, 19, 20 et 21 du gène (1) du récepteur du facteur de croissance épidermique (Epidermal growth factor receptor, *EGFR*) dans l'ADN de tissu tumoral et de plasma fixés au formol et inclus en paraffine (FFIP) de patients souffrant d'un cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC).

Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit est en outre indiqué pour la mesure semi-quantitative des mutations des exons 18, 20 et 21 du gène *EGFR* du plasma humain dans la prise en charge des patients souffrant d'un CPNPC.

Ce test doit être utilisé par un personnel qualifié, dans un environnement de laboratoire professionnel.

Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit est destiné au diagnostic *in vitro*.

## Indication d'emploi

Le test doit permettre de sélectionner les patients souffrant d'un CPNPC en vue d'un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) de l'*EGFR*.

# Description et principe

## Résumé et explications

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

Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit est un test real-time PCR (Polymerase chain reaction – Amplification en chaîne par polymérase) pour la détection de 42 mutations dans l'oncogène *EGFR* à l'aide des technologies ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (10, 11) et clamp PCR pour la détection qualitative et l'identification des mutations dans l'oncogène *EGFR*, au niveau des exons 18, 19, 20 et 21 (Tableau 1). Le kit permet la semi-quantification de G719X (X = A, S ou C ; exon 18), T790M (exon 20), C797Sa et C797Sb (exon 20), S768I (exon 20), L858R (exon 21) et L861Q (exon 21) dans des échantillons d'ADN extraits du plasma humain. En résumé :

- G719X dans l'exon 18 (détection et semi-quantification de G719S, G719A ou G719C, mais sans distinction entre ces mutations)
- 28 délétions dans l'exon 19 (détection de n'importe laquelle de ces 28 délétions mais sans distinction entre elles)
- S768I, T790M, C797Sa et C797Sb dans l'exon 20 (détection et semi-quantification de ces quatre mutations mais sans distinction entre C797Sa et C797Sb)
- Cinq insertions dans l'exon 20 (détection de n'importe laquelle de ces cinq insertions mais sans distinction entre elles)

Les méthodes utilisées étant hautement sélectives, elles permettent, en fonction de la quantité totale d'ADN présente, de détecter un faible pourcentage d'ADN mutant dans un fond d'ADN génomique de type sauvage. Ces limites de sélectivité et de détection sont supérieures aux technologies telles que le séquençage à l'aide de nucléotides marqués.

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

Exon	Mutation	COSMIC ID*	Changement de base
18	G719A	6239	c.2156G>C
	G719S	6252	c.2155G>A
	G719C	6253	c.2155G>T
19	Délétions	26038	c.2233_2247del15
		13550	c.2235_2248>AATTC
		6223	c.2235_2249del15
		6225	c.2236_2250del15
		18427	c.2237_2257>TCT
		6220	c.2238_2255del18
		12367	c.2237_2254del18
		12384	c.2237_2255>T
		12678	c.2237_2251del15
		13551	c.2235_2252>AAT
		13552	c.2235_2251>AATTC
		12386	c.2237_2252>T
		12416	c.2237_2253>TTGCT
		12728	c.2236_2253del18
		12422	c.2238_2248>GC
12382	c.2239_2248TTAAGAGAAG>C		

Suite du tableau page suivante



Suite du tableau de la page précédente

**Tableau 1. Liste des mutations et des identifiants COSMIC (suite)**

Exon	Mutation	COSMIC ID*	Changement de base
19	Délétions	6218	c.2239_2247delTTAAGAGAA
		12387	c.2239_2258>CA
		12370	c.2240_2257del18
		12403	c.2239_2256>CAA
		6255	c.2239_2256del18
		12383	c.2239_2251>C
		12419	c.2238_2252>GCA
		6210	c.2240_2251del12
		23571	c.2238_2252del15
		12369 <sup>†</sup>	c.2240_2254del15
		13556	c.2253_2276del24
12385	c.2235_2255>AAT		
20	S768I	6241	c.2303G>T
	Insertions	12376	c.2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	c.2310_2311insGGT
		12377	c.2319_2320insCAC
		13428	c.2311_2312insGCGTGGACA
		13558	c.2309_2310AC>CCAGCGTGGAT
	T790M	6240	c.2369C>T
	C797Sa	6493937	c.2389T>A
C797Sb	5945664	c.2390G>C	

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

**Tableau 1. Liste des mutations et des identifiants COSMIC (suite)**

Exon	Mutation	COSMIC ID*	Changement de base
21	L858R	6224	c.2573T>G
	L861Q	6213	c.2582T>A

\*COSMIC : Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (Catalogue des mutations somatiques associées au cancer) : <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

† Conformément à la nouvelle base de données COSMIC, compte tenu des similitudes dans la séquence une fois la délétion effectuée, la délétion 6254 est associée à la délétion 12369.

## Principe de la procédure

Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit utilise la real-time PCR pour la détection de 42 mutations dans le gène *EGFR* (exons 18, 19, 20 et 21) et la semi-quantification de G719X (avec X = A, S ou C ; exon 18), T790M (exon 20), C797Sa et C797Sb (exon 20), S768I (exon 20), L858R (exon 21) et L861Q (exon 21) dans des échantillons d'ADN extraits du plasma humain. Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit permet de tester l'ADN génomique (ADNg) extrait de tissu tumoral FFIP et l'ADN libre circulant (ADNlc) extrait d'échantillons de plasma de patients souffrant d'un cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC). Le statut mutationnel de l'EGFR et la semi-quantification (le cas échéant) de l'ADNlc pur sont déterminés à l'aide du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM équipé de la version 2.1 (ou supérieure) du logiciel Rotor-Gene AssayManager (RGAM) associée à la version 1.0.0 (ou supérieure) du plug-in Gamma liée au profil du dosage dédié au plasma. L'analyse des données et l'interprétation des résultats sont entièrement automatisées et assurées par RGAM (Figure 1).

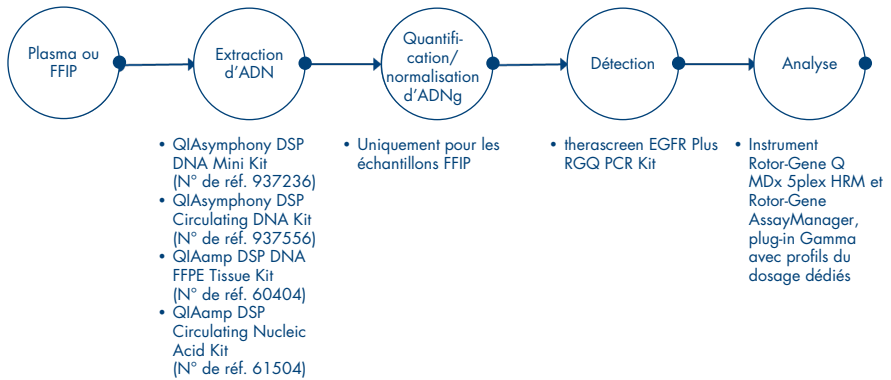


Figure 1. Procédure avec le *theascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit.

---

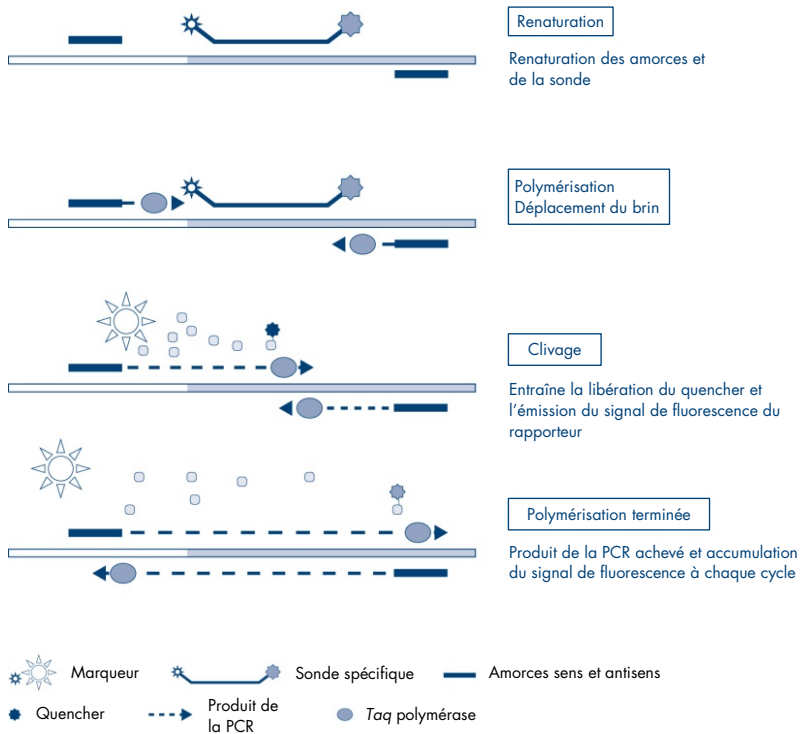
## Technologie

L'utilisation de la qPCR permet de détecter avec précision les produits de la PCR pendant la phase exponentielle du processus d'amplification par PCR. Les données de qPCR peuvent être obtenues rapidement, sans traitement post-PCR, grâce à une détection en temps réel de signaux fluorescents pendant le cycle de PCR.

Les dosages *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR exploitent le principe d'hydrolyse des oligonucléotides par qPCR. Pendant la PCR, des amorces sens et antisens s'hybrident à une séquence spécifique. Un autre oligonucléotide lié à un marqueur est contenu dans le même mélange. Cette sonde, composée d'un oligonucléotide marqué par un colorant rapporteur 5' et un quencher 3' non marqué en aval, s'hybride à une séquence cible à l'intérieur du produit de la PCR. L'analyse qPCR avec sondes d'hydrolyse exploite l'activité exonucléase 5'→3' du *Thermus aquaticus* (*Taq*) ADN polymérase. Lorsque la sonde est intacte, la proximité du colorant rapporteur et du quencher entraîne la suppression de la fluorescence du rapporteur principalement par transfert d'énergie de type Förster.

Durant la PCR, si la cible d'intérêt est présente, les amorces sens et antisens se fixent spécifiquement et cernent la sonde. L'activité exonucléase 5'→3' de l'ADN polymérase coupe la sonde entre le rapporteur et le quencher, seulement si les 3 oligonucléotides sont hybridés à la cible. Les fragments de la sonde sont alors séparés de la cible, puis la polymérisation du brin se poursuit. L'extrémité 3' de la sonde est bloquée afin d'éviter l'extension de la sonde lors de la PCR (Figure 2). Ce processus intervient à chaque cycle et n'interfère pas avec l'accumulation exponentielle du produit.

L'augmentation du signal fluorescent n'est détectée que si la séquence cible est complémentaire des amorces et de la sonde et donc amplifiée durant la PCR.

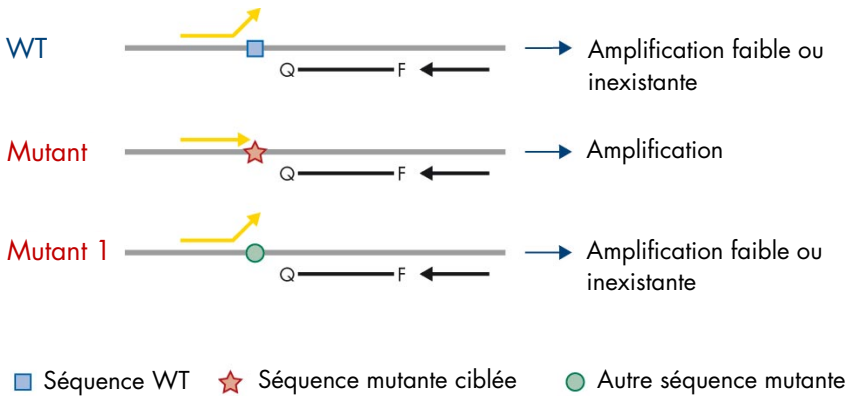


**Figure 2. Principe de la réaction.**

Dans le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, les réactions propres aux mutations utilisent les technologies ARMS (Amplification Refractory Mutation System) et clamp pour la détection, l'identification et la semi-quantification (le cas échéant) des mutations dans l'ADN extrait du plasma.

## ARMS

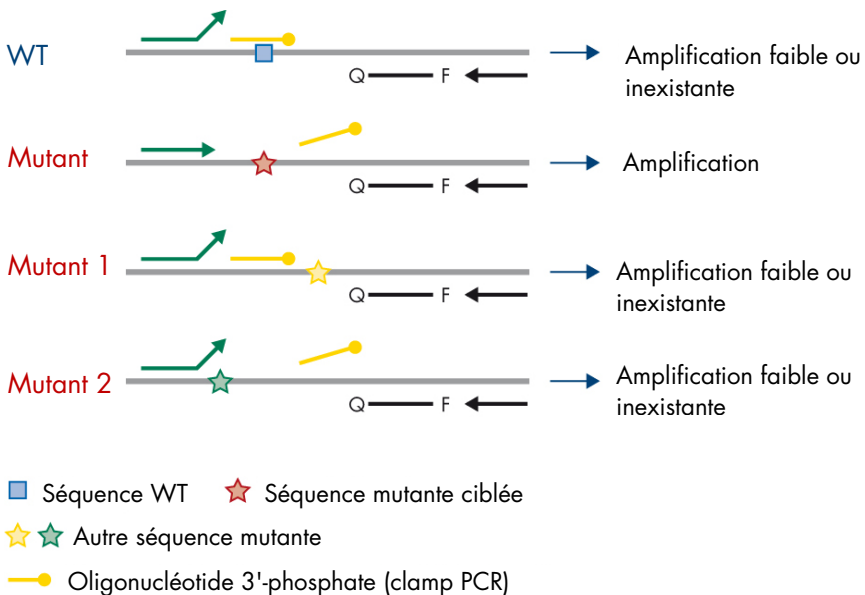
L'ARMS exploite la capacité de la Taq ADN polymérase à distinguer un appariement d'un mésappariement à l'extrémité 3' d'une amorce de PCR. Lorsque l'amorce est entièrement appariée, l'amplification s'effectue avec une efficacité maximale. Lorsque la base en 3' est mésappariée, seule une faible amplification de fond se produit. Par conséquent, une séquence mutée est amplifiée sélectivement, même dans les échantillons dans lesquels la majorité de l'ADN ne porte pas la mutation (Figure 3).



**Figure 3. Identification des mutations spécifiques par ARMS PCR.** WT : type sauvage. Q—F : sonde doublement marquée. D : amorces sens et antisens.

## Clamp PCR

Cette méthode permet de détecter plusieurs variants localisés dans le même point chaud (p. ex. les délétions de l'*EGFR* au niveau de l'exon 19). Le dosage clamp associe les amorces et la sonde standard avec un oligonucléotide supplémentaire dont l'extrémité 3' est bloquée par l'ajout d'un groupe phosphate afin d'empêcher l'élongation de la PCR. L'oligonucléotide clamp, de même que les amorces et la sonde, sont propres à la séquence de type sauvage (clamp PCR). Si la matrice de PCR contient la séquence de type sauvage, le clamp s'hybride avant l'amorce car un  $T_m$  plus important entraîne une amplification faible ou inexistante. A contrario, si une séquence mutée est présente, le clamp ne peut se lier, cela permet la renaturation et l'amplification de l'amorce (Figure 4).



**Figure 4. Détection de mutation par la technologie clamp.** WT : type sauvage. Q—F : sonde doublement marquée. D : amorces sens et antisens.

# Matériel fourni

## Contenu du kit

<b><i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit</b>			<b>(24)</b>
<b>N° de référence</b>			<b>874611</b>
<b>Nombre de réactions</b>			<b>24</b>
<b>Couleur</b>	<b>Désignation</b>	<b>Identifiant du tube</b>	<b>Volume</b>
Vert	T790M & L861Q Mix (Mélange T790M & L861Q)	EGFR T790M & L861Q Mix (Mélange T790M & L861Q EGFR)	280 µl
Jaune	Insertions & G719X Mix (Mélange insertions & G719X)	EGFR Insertions & G719X Mix (Mélange insertions & G719X EGFR)	280 µl
Violet	L858R & C797S Mix (Mélange L858R & C797S)	EGFR L858R & C797S Mix (Mélange L858R & C797S EGFR)	280 µl
Orange	Deletions & S768I Mix (Mélange délétions & S768I)	EGFR Deletions & S768I Mix (Mélange délétions & S768I EGFR)	280 µl
Rouge	EGFR Positive Control (Contrôle positif EGFR)	EGFR Positive Control (Contrôle positif EGFR)	190 µl
Bleu	PCR Master Mix (Mélange principal PCR)	EGFR PCR Master Mix (Mélange principal PCR EGFR)	2 x 940 µl
Incolore	Water for NTC (Eau pour contrôle sans matrice)	NTC (Contrôle sans matrice)	1,9 ml
Incolore	Water for sample dilution (Eau pour dilution de l'échantillon)	Dil. (Dilution)	1,9 ml

**Remarque :** le contenu du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit est suffisant pour 24 échantillons (le kit contient assez de réactifs pour effectuer jusqu'à quatre cycles de qPCR avec six échantillons par cycle, y compris les contrôles).



---

## Format du kit et dosages

### Dosages de mutation

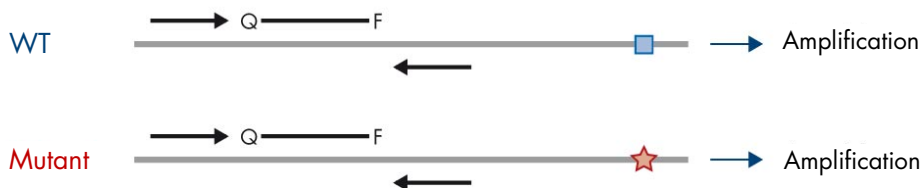
Quatre mélanges d'amorces et sondes sont fournis dans le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit :

- T790M et L861Q
- Insertions (exon 20) et G719X
- L858R et C797S
- Délétions (exon 19) et S768I

Tous les mélanges d'amorces et sondes, une fois associés au mélange principal PCR, permettent la détection de cibles marquées à la carboxyfluorescéine (FAM™), au CAL Fluor® Red 610 et d'un contrôle interne marqué à l'hexachlorofluorescéine (HEX™).

### Dosage de contrôle interne

La réaction de contrôle d'amplification interne, marquée à l'HEX, permet d'évaluer l'ADN matriciel total amplifiable de l'*EGFR* dans un échantillon muté et un échantillon non muté (de type sauvage) (Figure 5), et d'identifier les échecs de la réaction dus à un ajout d'ADN non optimal ou à la présence de substances inhibitrices dans la matrice d'échantillons. Cette réaction d'amplification interne amplifie une région de l'exon 2 du gène *EGFR*. Les amorces et la sonde sont conçues pour éviter tout polymorphisme connu de l'*EGFR*.



■ Séquence WT    ★ Séquence mutante ciblée

**Figure 5. Détection du contrôle interne (CI) au niveau de l'exon 2 de l'EGFR.** WT : type sauvage.  
Q—F : sonde doublement marquée. D : amorces sens et antisens.

## Eau pour dilution de l'échantillon (Dilution)

Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit contient de l'eau sans nucléase à utiliser pour la dilution de l'échantillon d'ADNg.

## Contrôles

Chaque cycle de PCR doit contenir un contrôle positif (CP) et un contrôle négatif (NTC) pour chacun des quatre dosages.

### Contrôle positif (CP)

Chaque cycle doit contenir un contrôle positif dans les tubes 1 à 4. Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit contient un contrôle positif (CP) d'*EGFR* à utiliser comme matrice dans la réaction du contrôle positif. Les résultats du contrôle positif sont évalués automatiquement par Rotor-Gene AssayManager® pour garantir que les performances du kit sont conformes aux critères d'acceptation prédéfinis.

## Contrôle sans matrice (NTC)

Chaque cycle doit contenir un contrôle négatif (Contrôle sans matrice, NTC) dans les tubes 5 à 8. Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit contient de l'eau pour contrôle sans matrice à utiliser comme « matrice » pour le contrôle sans matrice. Le contrôle sans matrice permet d'évaluer une éventuelle contamination des réactifs et de l'environnement.

## Plate-forme et logiciel

Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit est spécifiquement conçu pour être utilisé sur les instruments\* Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM avec les canaux de fluorescence pour Cycling Green, Yellow et Red, avec le logiciel principal Rotor-Gene AssayManager v2.1.X (X≥0), le plug-in Gamma v1.0.X (X≥0) et les profils du dosage *therascreen* EGFR Plus.

Deux profils du dosage *therascreen* EGFR sont à votre disposition : le **therascreen EGFR Plus FFPE** (pour l'évaluation des échantillons FFIP) et le **therascreen EGFR Plus Plasma** (pour l'évaluation des échantillons de plasma). Les profils du dosage contiennent les paramètres du cycle de PCR ainsi que les paramètres d'analyse permettant une interprétation automatisée des résultats.

\* Vérifiez que les instruments et l'équipement ont été contrôlés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

# Matériel nécessaire, mais non fourni

## Réactifs supplémentaires pour la préparation des échantillons

- Deparaffinization Solution (N° de réf. 19093 ou 939018) pour la préparation manuelle et automatisée de l'ADNg à partir d'échantillons FFIP
- QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (N° de réf. 937236) pour la préparation automatisée de l'ADNg à partir d'échantillons FFIP
- QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (N° de réf. 937556) pour la préparation automatisée de l'ADNlc à partir d'échantillons de plasma
- QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit (N° de réf. 60404) pour la préparation manuelle de l'ADNg à partir d'échantillons FFIP
- QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (N° de réf. 61504) pour la préparation manuelle de l'ADNlc à partir d'échantillons de plasma

**Remarque** : le matériel nécessaire mais non fourni destiné aux kits d'extraction d'ADN indiqué ci-dessus est détaillé dans les manuels correspondants.

- RNase A (N° de réf. 19101) pour la préparation manuelle ou automatisée d'échantillons d'ADNg à partir d'échantillons FFIP
- Buffer ATL (N° de réf. 939016) pour le protocole de déparaffinage utilisé avec le QIASymphony DSP DNA Mini Kit (N° de réf. 937236) ou le QIASymphony DNA Mini Kit (N° de réf. 931236)

## Consommables et équipement général de laboratoire

- Pipettes dédiées\* (réglables) pour la préparation des échantillons
- Pipettes dédiées\* (réglables) pour la préparation du mélange réactionnel de PCR
- Pipettes dédiées\* (réglables) pour la distribution de l'ADN matriciel

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

- Pointes de pipettes pour PCR stériles, sans nucléase et résistantes aux aérosols, avec filtres hydrophobes (les pointes de pipettes avec filtre de protection contre les aérosols sont recommandées afin d'éviter toute contamination croisée)
- Agitateur vortex\*
- Centrifugeuse de paillasse\* avec rotor pour tubes de réaction de 0,5 ml, 1,5 ml et 2,0 ml (capable d'atteindre 13 000 à 14 000 tr/min)
- Tubes de microcentrifugation stériles sans DNase, sans RNase, sans ADN, de 1,5 ou 2,0 ml pour la préparation d'ADN et les mélanges réactionnels de PCR
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml pour instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (N° de réf. 981103 ou 981106)
- Instrument de quantification d'ADN
- Tubes à échantillon (p. ex. tube Sarstedt de 2 ml [N° de réf. 72.693]) pour la préparation automatisée d'ADNg (à partir de blocs FFIP). Les formats de tubes primaires et secondaires compatibles sont répertoriés sur le site [www.qiagen.com/goto/dspdnakits](http://www.qiagen.com/goto/dspdnakits).
- Scalpel stérile à usage unique pour la préparation manuelle et automatisée d'ADNg (à partir d'une section FFIP d'un échantillon sur lamelle)
- Tampon phosphate salin stérile pour IVD (peut être nécessaire pour compléter les volumes d'échantillon de plasma)

## Équipement

### Équipement pour préparation automatisée des échantillons

- Instrument QIASymphony SP\* (N° de réf. 9001297) et accessoires fournis  
**Remarque** : les accessoires requis sont détaillés dans les manuels des kits d'extraction correspondants et dans la *Description générale du Manuel d'utilisation QIASymphony SP/AS*.
- Logiciel QIASymphony version 4.0 ou supérieure

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

- Protocole QIASymphony Tissue\_LC\_200\_DSP pour la préparation automatisée d'ADNg à partir d'échantillons FFIP (voir [www.qiagen.com/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiasymphony-dsp-dna-kits-row/#resources](http://www.qiagen.com/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiasymphony-dsp-dna-kits-row/#resources))
- Protocole QIASymphony circDNA\_2000\_DSP pour la préparation automatisée d'ADNlc à partir d'échantillons de plasma (voir [www.qiagen.com/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiasymphony-dsp-circulating-dna-kit/#resources](http://www.qiagen.com/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiasymphony-dsp-circulating-dna-kit/#resources))

## Équipement et matériel pour la qPCR

- Instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM\* avec canaux de fluorescence pour Cycling Green, Cycling Red et Cycling Yellow (détection de FAM, CAL Fluor Red 610 et HEX, respectivement)
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes : bloc en aluminium pour la préparation manuelle de réaction avec une pipette monocanal (N° de réf. 9018901)
- 72-Well Rotor (N° de réf. 9018903), Locking Ring 72-Well Rotor (N° de réf. 9018904) et Rotor Holder (N° de réf. 9018908)
- Logiciel Rotor-Gene AssayManager version 2.1.x (où x = 1 ou plus)
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in installé, version 1.0.x (où x = 0 ou plus)
- Profil du dosage EGFR RGQ PCR version 1.0.x (où x = 0 ou plus)
  - **therascreen\_EGFR\_Plus\_FFPE** pour les échantillons FFIP
  - **therascreen\_EGFR\_Plus\_Plasma** pour les échantillons de plasma

\* Dans certains pays, le cas échéant, il est possible d'utiliser l'instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM produit en mai 2011 ou ultérieurement. La date de production peut être déduite du numéro de série à l'arrière de l'instrument. Le numéro de série est affiché au format « mmaann » où « mm » correspond au mois de production en chiffres, « aa » correspond aux deux derniers chiffres de l'année de production et « nnn » est l'identifiant unique de l'instrument.

---

# Avertissements et précautions

Pour les clients dans l'Union européenne, notez qu'il peut être nécessaire de rapporter tout incident grave survenant en lien avec le produit au fabricant et à l'autorité compétente du pays membre de l'utilisateur et/ou du patient.

## Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, portez 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. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.

Pour les informations de sécurité concernant les instruments QIASymphony SP et Rotor-Gene Q, consultez le manuel d'utilisation fourni avec l'instrument.

- 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.
- Éliminez les échantillons et les dosages usagés conformément aux procédures de sécurité locales.

## Précautions

L'utilisation du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit nécessite de bonnes pratiques de laboratoire, incluant la traçabilité, la maintenance de l'équipement spécifique à la biologie moléculaire et le respect des réglementations applicables et des normes pertinentes.

---

L'utilisation de ce kit est destinée au diagnostic *in vitro*. Les réactifs et les instructions fournis dans ce kit ont été testés pour obtenir des performances optimales.

L'utilisateur doit toujours respecter les mesures suivantes :

- Le test doit être utilisé avec des échantillons FFIP et des échantillons de plasma CPNPC.
- Veillez bien à éviter toute contamination des échantillons et réactifs avec un matériel positif *EGFR* (c.-à-d. contrôle positif) ou un matériel potentiellement positif *EGFR* (c.-à-d. échantillons à tester).
  - Utilisez un scalpel différent pour chaque échantillon de tissu prélevé par grattage.
  - Utilisez des pipettes dédiées distinctes pour l'extraction/la préparation d'ADN, la configuration des mélanges réactionnels de PCR (préparation de mélange réactionnel pré-PCR) et l'ajout d'ADN matriciel dans les tubes de PCR.
  - Utilisez des nouvelles pointes de pipette résistantes aux aérosols pour toutes les étapes de pipetage afin d'éviter la contamination croisée des échantillons et des réactifs. Veillez bien à éviter les contaminations par transfert de l'ADN ou du produit de la PCR qui peuvent générer un signal faux positif.
  - La préparation et la distribution des mélanges réactionnels doivent être effectuées dans une zone dédiée distincte de la zone de préparation d'ADN dans laquelle aucune matrice d'ADN (ADN, plasmide ou produits de la PCR) n'est introduite. Dans cette même zone, ajoutez de l'eau dans les tubes NTC puis fermez-les.
  - Ajoutez l'ADN matriciel dans une zone distincte, de préférence dans une autre pièce, avec un équipement dédié (pipettes, pointes, etc.).
  - Les tubes du Rotor-Gene Q ne doivent pas être ouverts après la fin du cycle de PCR. Cela permet d'éviter toute contamination du laboratoire avec les produits obtenus post-PCR.
- Les réactifs du *therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit* doivent rester à l'abri de la lumière et ne doivent subir ni variations de température ni cycles répétés de congélation-décongélation, sans quoi les performances du kit pourraient s'en trouver altérées.



- Les composants congelés sont décongelés à température ambiante (15 à 25 °C) (ou au réfrigérateur entre 2 et 8 °C) et restent à l'abri de la lumière. Vérifiez fréquemment si le matériel est décongelé.
- Tous les produits chimiques et biologiques sont potentiellement dangereux. Les prélèvements et échantillons sont potentiellement infectieux et doivent être traités comme du matériel présentant un risque biologique.
- Les réactifs du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit ont été dilués de manière optimale. N'effectuez pas de dilution supplémentaire des réactifs, cela pourrait compromettre les performances.
- N'utilisez pas de volumes réactionnels (mélange réactionnel plus échantillon) inférieurs à 25 µl, cela augmente le risque de résultat faux négatif.
- Tous les réactifs fournis dans le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit doivent être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans le même *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit.
- Ne remplacez pas les réactifs du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit et ne mélangez pas les réactifs de plusieurs lots de *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, cela pourrait compromettre les performances.
- N'utilisez pas de composants périmés ou mal conservés.
- Procédez avec prudence pour tester et analyser correctement les échantillons, faites particulièrement attention à la bonne élimination des échantillons incorrects, aux erreurs de chargement, aux erreurs de pipetage et au positionnement des tubes de PCR en barrettes dans les emplacements appropriés du 72-Well Rotor.
- Veillez à manipuler les échantillons de manière systématique afin d'assurer une identification correcte et une bonne traçabilité.
- Faites preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination par la DNase, qui peut provoquer la dégradation de l'ADN matriciel. Utilisez un matériel exempt de nucléase (p. ex. pipettes, pointes de pipette, tubes) et portez des gants lors du dosage.
- **Remarque** : ce produit est réservé à un personnel expérimenté qui maîtrise les procédures de laboratoire et l'utilisation de l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

---

# Conservation et manipulation des réactifs

Prêtez attention aux dates de péremption et aux conditions de conservation imprimées sur l'emballage et les étiquettes des composants. N'utilisez pas de composants périmés ou mal conservés.

## Conditions d'expédition

Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit est expédié sur un lit de glace sèche et doit arriver encore congelé. Si l'un des composants du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit arrive non congelé, si l'emballage externe a été ouvert au cours du transport ou si le colis ne contient pas le mode d'emploi ou les réactifs, contactez l'un des services techniques QIAGEN ou l'un des distributeurs locaux (visitez le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Pour connaître les conditions d'expédition des kits d'extraction d'ADN et des réactifs à utiliser, consultez les manuels correspondants.

## Conditions de conservation

Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit doit être conservé dès réception à une température comprise entre  $-30$  et  $-15$  °C dans un congélateur à température constante et à l'abri de la lumière.

**Remarque** : toutes les sondes marquées en fluorescence présentes dans les réactifs du mélange réactionnel sont photosensibles. Mettez les réactifs du mélange réactionnel à l'abri de la lumière afin d'éviter tout photoblanchiment.

---

Évitez de répéter les cycles de congélation-décongélation. Dans l'idéal, les réactifs ne doivent pas subir plus de quatre cycles de congélation-décongélation.

Pour connaître les informations de conservation et de manipulation des kits d'extraction d'ADN et des réactifs à utiliser, consultez les manuels correspondants.

## Stabilité

Lorsqu'il est conservé dans les conditions de conservation spécifiées, le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Évitez toute congélation-décongélation inutile du contenu de ce kit.

Une fois ouverts, les réactifs peuvent être conservés dans leur emballage d'origine à une température comprise entre  $-30$  et  $-15$  °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. La durée totale précédant le cycle une fois les réactions de PCR préparées ne doit pas dépasser 24 heures en cas de conservation au réfrigérateur (2 à 8 °C ; cette durée inclut la préparation et la conservation de la PCR).

Pour connaître les informations de stabilité des kits d'extraction d'ADN et des réactifs à utiliser, consultez les manuels correspondants.

Prêtez attention aux dates de péremption et aux conditions de conservation imprimées sur l'emballage et les étiquettes des composants. N'utilisez pas de composants périmés ou mal conservés.

---

# Conservation et manipulation des échantillons

Le matériel d'échantillon est de l'ADN génomique humain extrait de tissu tumoral FFIP ou de l'ADN libre circulant (ADNlc) extrait de plasma 2K-EDTA.

Les échantillons doivent être transportés conformément aux normes méthodologiques en pathologie pour garantir leur bonne qualité.

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

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

## Échantillons FFIP

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

Pour préparer des échantillons tissulaires à l'extraction d'ADNg :

- Les procédures standard de fixation au formol et d'inclusion en paraffine doivent être respectées. Consultez le manuel du kit d'extraction concerné pour plus de détails.

- À l'aide d'un microtome, faites des coupes sériées de 5 µm dans le bloc de paraffine et placez-les sur des lames en verre. Sollicitez un professionnel expérimenté (p. ex. un pathologiste) pour évaluer une coupe colorée à l'hématoxyline-éosine (H&E) afin de confirmer la présence d'une tumeur. Les coupes colorées ne doivent pas être utilisées pour l'extraction d'ADN.
- Le matériel de départ pour la purification d'ADNg sont des coupes de tissu FFIP (dans l'idéal, fraîchement coupées).
- Conservez tous les blocs et toutes les lames FFIP à température ambiante (15 à 25 °C). Les coupes FFIP sur lamelles de verre peuvent être conservées à température ambiante jusqu'à 1 mois avant l'extraction d'ADN.

## Échantillons de plasma

Respectez les procédures standard de laboratoire pour préparer le plasma à partir d'échantillons de sang total 2K-EDTA. Consultez le manuel du kit d'extraction concerné pour plus de détails.

Si vous utilisez du plasma frais pour l'extraction des acides nucléiques le jour même, conservez-le entre 2 et 8 °C jusqu'au traitement ultérieur. Pour une conservation plus longue, congelez le plasma entre -30 et -15 °C ou entre -90 et -65 °C. Il est recommandé d'utiliser des aliquotes pour éviter de congeler-décongeler les échantillons de plasma. La répétition des cycles de congélation-décongélation entraîne la dénaturation et la précipitation des protéines, ce qui peut réduire le nombre d'acides nucléiques libres circulants.

## Échantillons d'ADN génomique et d'ADN libre circulant

L'ADN génomique extrait de tissu FFIP et l'ADN libre circulant extrait de plasma doivent être conservés entre 2 et 8 °C pour une conservation de courte durée (jusqu'à 24 heures) et entre -30 et -15 °C (ou entre -90 et -65 °C) si une conservation de longue durée est nécessaire. Évitez toute congélation-décongélation inutile de l'ADNg et de l'ADNlc. Les éluats congelés ne doivent pas être dégelés plus de trois fois.

# Procédure

## Protocole : extraction et préparation de l'ADN

### Étapes préliminaires

- Assurez-vous que l'opérateur est formé à l'utilisation des instruments et des kits d'extraction nécessaires à l'extraction d'ADN et à la préparation des échantillons. Une formation à l'utilisation des instruments peut, si nécessaire, être dispensée lors de l'installation (voir « Informations de commande », page 113).
- Lisez la section « Matériel nécessaire, mais non fourni » dans chaque manuel de kit d'extraction pour identifier les accessoires requis pour chaque procédure :
- QIASymphony DSP DNA Mini Kit (N° de réf. 937236) pour la préparation automatisée de l'ADNg (à partir d'échantillons FFIP)
- QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (N° de réf. 937556) pour la préparation automatisée de l'ADNlc (à partir d'échantillons de plasma)
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (N° de réf. 60404) pour la préparation manuelle de l'ADNg (à partir d'échantillons FFIP)
- QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (N° de réf. 61504) pour la préparation manuelle de l'ADNlc (à partir d'échantillons de plasma)

## Protocole : extraction d'ADNg à partir d'échantillons FFIP

Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit n'a été testé qu'avec la QIAGEN Deparaffinization Solution (N° de réf. 19093 ou 939018) pour le déparaffinage d'une section FFIP avec les kits d'extraction d'ADN suivants :

- QIASymphony DSP DNA Mini Kit (N° de réf. 937236) pour l'extraction automatisée
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (N° de réf. 60404) pour l'extraction manuelle

## Points importants avant de commencer

Applicable aux protocoles d'extraction automatisée et d'extraction manuelle :

- Assurez-vous que les réactifs pour l'extraction d'ADN ne sont pas périmés et qu'ils ont été transportés et conservés dans de bonnes conditions.
- N'utilisez pas de composants périmés ou mal conservés.
- Vous pouvez regrouper dans une préparation entre une et quatre coupes de tissus FFIP, chacune de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, ou entre deux et huit coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur maximale.
- Utilisez exclusivement la Deparaffinization Solution pour le déparaffinage FFIP, conformément à la procédure « Protocole de prétraitement à utiliser avec le QIASymphony DSP DNA Mini Kit » page 33 ou « Protocole : protocole de prétraitement à utiliser avec le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit » page 36.

**Remarque** : la Deparaffinization Solution n'est pas fournie dans les kits d'extraction, elle doit être commandée séparément (voir « Informations de commande », page 113).

- Utilisez de la RNase A pour limiter le contenu d'ARN (inclus dans la procédure « Protocole : déparaffinage d'une section FFIP avec la QIAGEN Deparaffinization Solution » page 33).

**Remarque** : la RNase A n'est pas fournie dans les kits d'extraction, elle doit être commandée séparément (voir « Informations de commande », page 113).

- Il peut être nécessaire de diluer l'échantillon avant le test de qPCR (voir « Protocole : quantification et normalisation de l'ADNg », page 41) ou pour la conservation.
- L'ADN isolé à partir d'échantillons FFIP est souvent d'un poids moléculaire inférieur à l'ADN provenant d'échantillons frais ou congelés. Le degré de fragmentation dépend du type et de l'âge de l'échantillon ainsi que des conditions utilisées lors de la fixation.
- Pour la conservation de l'ADN après extraction, voir « Échantillons d'ADN génomique et d'ADN libre circulant », page 29.

## Protocole : extraction automatisée d'ADNg à partir d'échantillons FFIP à l'aide du QIASymphony SP

Si vous utilisez le QIASymphony DSP DNA Mini Kit (N° de réf. 937236) pour l'extraction automatisée, procédez à l'extraction de l'ADN conformément aux consignes du manuel en tenant compte des points suivants :

- Utilisez exclusivement la Deparaffinization Solution pour le déparaffinage FFIP, conformément à la procédure « Protocole de prétraitement à utiliser avec le QIASymphony DSP DNA Mini Kit » page 33.

**Remarque** : la Deparaffinization Solution n'est pas fournie dans les kits d'extraction, elle doit être commandée séparément (voir « Informations de commande », page 113).

- Sélectionnez le protocole Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP sur l'instrument QIASymphony SP (pour plus de détails, consultez le protocole *QIASymphony SP Protocol Sheet Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP*)
- Utilisez un volume d'élution de 50 µl.
- Pour toutes informations supplémentaires concernant l'instrument QIASymphony SP, consultez le manuel d'utilisation qui l'accompagne.

## Protocole : extraction manuelle d'ADNg à partir d'échantillons FFIP

Si vous utilisez le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (N° de réf. 60404) pour l'extraction manuelle, procédez à l'extraction de l'ADN conformément aux consignes du manuel en tenant compte des points suivants :

- Utilisez exclusivement la Deparaffinization Solution pour le déparaffinage FFIP, conformément à la procédure « Protocole : protocole de prétraitement à utiliser avec le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit » page 36.

**Remarque** : la Deparaffinization Solution n'est pas fournie dans les kits d'extraction, elle doit être commandée séparément (voir « Informations de commande », page 113).

- Utilisez un volume d'élution de 50 µl.



## Protocole : déparaffinage d'une section FFIP avec la QIAGEN Deparaffinization Solution

Protocole de prétraitement à utiliser avec le QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Ce protocole de prétraitement doit être utilisé avec le QIASymphony DSP DNA Mini Kit (pour l'extraction automatisée), il est basé sur le protocole *QIASymphony SP Protocol Sheet Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP* (Méthode 1 : déparaffinage avec la Deparaffinization Solution).

### Points importants avant de commencer

- Laissez tous les tampons revenir à température ambiante (15 à 25 °C) et la Deparaffinization Solution à 20 à 25 °C.
- Les particules magnétiques du QIASymphony permettent la co-purification de l'ARN et de l'ADN si tous deux sont présents dans l'échantillon. Afin de limiter le contenu en ARN dans l'échantillon, ajoutez de la RNase A à l'échantillon à l'étape indiquée dans le protocole de prétraitement ci-après.
- Deparaffinization Solution, RNase A et Buffer ATL ne sont pas fournis avec le QIASymphony DSP DNA Mini Kit, ils doivent être commandés séparément (voir « Informations de commande », page 113).

### Étapes préliminaires

- Préchauffez un mélangeur chauffant ou un agitateur-incubateur à 56 °C pour l'étape 7.
- Vérifiez l'absence de précipité blanc dans le tampon ATL. Dissolvez si nécessaire le précipité en respectant le protocole *QIASymphony SP Protocol Sheet Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP*.

### Procédure

#### Commencer avec des blocs FFIP uniquement

1. À l'aide d'un scalpel, découpez la paraffine en excès du bloc d'échantillon. Réalisez entre une et quatre coupes de 10 µm d'épaisseur ou entre deux et huit coupes de 5 µm d'épaisseur.  
**Remarque** : si la surface de l'échantillon a été exposée à l'air, mettez au rebut les 2–3 premières coupes.

2. Mettez immédiatement les coupes dans un tube à échantillon de 2 ml compatible avec le porte-tubes du QIASymphony SP (non fourni ; p. ex. Sarstedt, n° de réf. 72.693).
3. Passez à l'étape 4 ci-dessous (pour tous les échantillons).

### Commencer avec des coupes FFIP sur lamelle uniquement

1. Mettez 1 goutte de Deparaffinization Solution sur chaque lamelle à l'aide des pipettes dédiées à la préparation des échantillons.
2. Grattez le matériel d'échantillon avec un scalpel stérile à usage unique afin de prélever la totalité des tissus. Mettez les agrégats dans un tube à échantillon de 2 ml compatible avec le porte-tubes du QIASymphony SP (non fourni ; p. ex. Sarstedt, n° de réf. 72.693).
3. Passez à l'étape 4 ci-dessous (pour tous les échantillons).

### Pour tous les échantillons

4. Ajoutez 200 µl de Buffer ATL aux coupes.
5. Ajoutez 20 µl de protéinase K.

**Remarque :** utilisez la protéinase K provenant du portoir de tubes d'enzyme du QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

6. Ajoutez 160 µl ou 320 µl de Deparaffinization Solution (voir le Tableau 2) puis mélangez en vortexant.

**Tableau 2. Volume de Deparaffinization Solution requis**

Épaisseur des coupes	Nombre de coupes	Volume de Deparaffinization Solution
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

---

7. Placez le tube dans un mélangeur chauffant ou un agitateur-incubateur et incubez-le à 56 °C pendant 1 heure en l'agitant à 1 000 tr/min jusqu'à ce que les tissus soient complètement lysés.

**Remarque :** le temps de lyse varie en fonction du type de tissu traité. Pour la plupart des tissus, la lyse est achevée en 1 heure. Si la lyse est inachevée après 1 heure, comme l'indique la présence de matériel insoluble, le temps de lyse peut être prolongé ou le matériel insoluble peut être sédimenté par centrifugation. Une lyse jusqu'au lendemain est possible et n'affecte en rien la préparation.

8. Incubez à 90 °C pendant 1 heure.

**Remarque :** l'incubation à 90 °C dans un Buffer ATL inverse partiellement la modification des acides nucléiques induite par le formaldéhyde. Des temps d'incubation plus longs ou des températures d'incubation plus élevées peuvent générer davantage d'ADN fragmenté. Si vous utilisez un seul bloc chauffant, laissez l'échantillon à température ambiante après l'incubation à 56 °C jusqu'à ce que le bloc chauffant atteigne 90 °C.

9. Afin de limiter le contenu en ARN dans l'échantillon, ajoutez 2 µl de RNase A (100 mg/ml) à la phase inférieure et incubez 2 minutes à température ambiante avant de passer à l'étape 10. Laissez l'échantillon revenir à température ambiante avant d'ajouter la RNase A.

10. Centrifugez à pleine vitesse pendant 1 minute à température ambiante.

11. Transférez avec soin les tubes (contenant les deux phases) vers le porte-tubes du QIASymphony SP.

12. Procédez à l'extraction en respectant les consignes du *Manuel du QIASymphony DSP DNA Mini Kit* (utilisez un volume d'élution de 50 µl).

## Protocole : protocole de prétraitement à utiliser avec le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

Ce protocole de prétraitement doit être utilisé avec le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (pour l'extraction manuelle), il est basé sur le « Protocole supplémentaire QIAGEN : purification d'ADN génomique à partir de tissus FFIP à l'aide du QIAamp DNA FFPE Tissue Kit et de la Deparaffinization Solution ».

### Points importants avant de commencer

- Effectuez toutes les étapes de centrifugation à température ambiante (15 à 25 °C).
- Laissez tous les tampons revenir à température ambiante et la Deparaffinization Solution à 20 à 25 °C.
- Deparaffinization Solution, RNase A et Buffer ATL ne sont pas fournis avec le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, ils doivent être commandés séparément (voir « Informations de commande », page 113).

### Étapes préliminaires

- Préchauffez un mélangeur chauffant ou un agitateur-incubateur orbital à 56 °C pour les étapes 6 et 10. En l'absence de mélangeur chauffant ou d'agitateur-incubateur orbital, un bloc chauffant ou un bain-marie peut être utilisé.
- Si le Buffer AL ou le Buffer ATL contient des précipités, dissolvez-les en respectant le protocole décrit dans le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.
- Assurez-vous que le Buffer AW1 et le Buffer AW2 ont été préparés conformément aux consignes du *Manuel du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*.

### Procédure

#### Commencer avec des blocs FFIP uniquement

1. À l'aide d'un scalpel, découpez la paraffine en excès du bloc d'échantillon. Faites des coupes de 5 à 10 µm d'épaisseur.

**Remarque** : si la surface de l'échantillon a été exposée à l'air, mettez au rebut les 2–3 premières coupes.

2. Placez immédiatement les coupes dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml ou 2 ml (non fourni).
3. Passez à l'étape 4 ci-dessous (pour tous les échantillons).

### Commencer avec des coupes FFIP sur lamelle uniquement

1. Mettez 1 goutte de Deparaffinization Solution sur chaque lamelle à l'aide des pipettes dédiées à la préparation des échantillons.
2. Grattez le matériel d'échantillon avec un scalpel afin de prélever la totalité des tissus. Mettez les agrégats dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml ou 2 ml (non fourni).
3. Passez à l'étape 4 ci-dessous (pour tous les échantillons).

### Pour tous les échantillons

4. Ajoutez 160  $\mu$ l ou 320  $\mu$ l de Deparaffinization Solution (Tableau 3) puis vortexez vigoureusement pendant 10 secondes.

**Tableau 3. Volume de Deparaffinization Solution requis**

Épaisseur des coupes	Nombre de coupes	Volume de Deparaffinization Solution
5 $\mu$ m	1–4	160 $\mu$ l
	5–8	320 $\mu$ l
10 $\mu$ m	1–2	160 $\mu$ l
	3–4	320 $\mu$ l

5. Centrifugez brièvement pour pouvoir prélever le contenu au fond du tube.
6. Incubez à 56 °C pendant 3 minutes puis laissez refroidir à température ambiante (15 à 25 °C).

7. Ajoutez 180 µl de Buffer ATL et mélangez en vortexant.
8. Centrifugez pendant 1 minute à 11 000 × g (10 000 tr/min). Deux phases apparaissent (une bleue et une transparente).
9. Ajoutez 20 µl de protéinase K à la phase inférieure transparente. Mélangez délicatement par aspiration-refoulement avec la pipette.
10. Incubez à 56 °C pendant 1 heure (ou jusqu'à ce que l'échantillon soit complètement lysé).
11. Incubez à 90 °C pendant 1 heure.

L'incubation à 90 °C dans un Buffer ATL inverse partiellement la modification des acides nucléiques induite par le formaldéhyde. Des temps d'incubation plus longs ou des températures d'incubation plus élevées peuvent générer davantage d'ADN fragmenté.

**Remarque :** si vous utilisez un seul bloc chauffant, laissez l'échantillon à température ambiante (15 à 25 °C) après l'incubation à 56 °C de l'étape 10 jusqu'à ce que le bloc chauffant ait atteint 90 °C pour l'étape 11.

12. Centrifugez brièvement le tube de 1,5 ml afin d'éliminer les gouttes présentes dans le bouchon.
13. Transférez la phase inférieure transparente dans un nouveau tube de microcentrifugation de 2 ml.
14. Ajoutez 2 µl de RNase A (100 mg/ml) puis incubez 2 minutes à température ambiante.
15. Passez à l'étape 12 (ajout de Buffer AL) du *Manuel du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* (utilisez un volume d'élution de 50 µl).

## Protocole : extraction d'ADNlc à partir d'échantillons de plasma

Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit a été testé avec les kits d'extraction d'ADN suivants :

- QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit (N° de réf. 937556) pour l'extraction automatisée de l'ADNlc (à partir d'échantillons de plasma)
- QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (N° de réf. 61504) pour l'extraction manuelle de l'ADNlc (à partir d'échantillons de plasma)


### Points importants avant de commencer

Applicable aux protocoles d'extraction automatisée et d'extraction manuelle :

- Assurez-vous que les réactifs pour l'extraction d'ADN ne sont pas périmés et qu'ils ont été transportés et conservés dans de bonnes conditions.
- N'utilisez pas de composants périmés ou mal conservés.
- Le matériel de départ pour la purification de l'ADNlc doit être du plasma préparé à partir de sang total 2K-EDTA. Les échantillons peuvent être frais ou congelés (à condition qu'ils n'aient pas subi plusieurs cycles de congélation-décongélation).
- La concentration en acides nucléiques libres circulants dans les liquides biologiques tels que le plasma est généralement faible et varie considérablement d'une personne à l'autre. Ainsi, l'ADNlc extrait d'échantillons de plasma ne sera ni quantifié ni normalisé (pas de dilution), il est utilisé directement dans la réaction de qPCR.
- Pour la conservation de l'ADN après extraction, consultez la section « Échantillons d'ADN génomique et d'ADN libre circulant », page 29.

## Protocole : extraction automatisée d'ADNlc à partir d'échantillons de plasma à l'aide du QIAasymphony SP

Si vous utilisez le QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit (N° de réf. 937556) pour l'extraction automatisée, procédez à l'extraction de l'ADN conformément aux consignes du manuel en tenant compte des points suivants :

- Sélectionnez le protocole circDNA\_2000\_DSP\_V1 sur l'instrument QIAasymphony SP (pour plus de détails sur le protocole, consultez le document *QIAasymphony SP Protocol Sheet circDNA\_2000\_DSP\_V1*)
-  Le volume d'échantillon recommandé pour le circDNA\_2000\_DSP est de 2 ml. Mais nous vous recommandons de commencer avec 2,4 ml pour éviter tout problème d'extraction lors du pipetage initial, comme indiqué dans le « Guide de dépannage » du *Manuel du QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit*. Si la quantité d'échantillon disponible est insuffisante, ajoutez un tampon phosphate salin stérile (non fourni) à l'échantillon jusqu'à obtenir le volume d'échantillon requis avant de le charger.
- Utilisez un volume d'élution de 60 µl.
- Pour toutes informations supplémentaires concernant l'instrument QIAasymphony SP, consultez le manuel d'utilisation qui l'accompagne.

## Protocole : extraction manuelle d'ADNlc à partir d'échantillons de plasma

Si vous utilisez le QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (N° de réf. 61504) pour la purification manuelle, procédez à l'extraction de l'ADN conformément aux consignes du manuel en tenant compte des points suivants :



- La purification des acides nucléiques circulants est effectuée à partir de 2 ml de plasma.
- Le protocole requiert un collecteur à vide (p. ex. le QIAvac 24 Plus avec le QIAvac Connecting System) et une pompe à vide capable de produire un vide de -900 à -800 mbar (p. ex. la QIAGEN Vacuum Pump).
- Utilisez un volume d'élution de 60 µl.

## Protocole : quantification et normalisation de l'ADNg

### Étapes préliminaires

Si vous utilisez des procédures d'extraction automatisée, consultez la colonne « Validity of result » (Validité des résultats) pour chaque échantillon dans le fichier de résultats du QIASymphony SP une fois le cycle terminé :

- Statut valide : passez à la quantification de l'ADNg.
- Statut incertain : peut être traité selon l'origine de l'indicateur (pour plus de détails sur les origines possibles de l'indicateur « unclear » [Incertain], consultez le manuel d'utilisation du QIASymphony SP/AS).
- Statut non valide : l'échantillon est rejeté. Répétez l'étape d'extraction.

### Procédure

L'ADNg extrait à partir d'échantillons FFIP doit être quantifié.

Si la concentration mesurée est inférieure à 4 ng/µl, l'échantillon doit être de nouveau extrait avec davantage de coupes (jusqu'à un maximum de huit coupes de 5 µm ou quatre de 10 µm).

Si la concentration mesurée est supérieure à 6 ng/µl, l'échantillon doit être dilué à 5 ng/µl avec de l'eau pour dilution de l'échantillon fournie dans le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, en respectant la formule suivante :

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

---

Où

$C_i$  : concentration initiale de l'ADNg extrait

$C_f$  : concentration finale à cibler = 5 ng/ $\mu$ l

$V_f$  : volume final nécessaire pour un cycle de *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR (autrement dit 20  $\mu$ l + volume supplémentaire pour erreur de pipetage)

$V_i$  : volume initial d'ADNg extrait à pipeter et diluer avec de l'eau pour dilution de l'échantillon fournie dans le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit (volume d'eau à ajouter =  $V_f - V_i$ )

Chaque réaction de PCR est optimisée pour 25 ng d'ADNg dilué dans un volume d'échantillon final de 5  $\mu$ l. Chaque échantillon étant testé avec les quatre mélanges réactionnels d'*EGFR*, il faut un total de 100 ng par échantillon testé.

**Remarque** : veillez à utiliser le tampon d'élution qui convient pour étalonner l'instrument de quantification.

L'ADNlc extrait à partir d'échantillons de plasma ne doit pas être quantifié. Chaque réaction de PCR est optimisée pour 5  $\mu$ l d'ADNlc extrait pur. Chaque échantillon étant testé avec les quatre mélanges réactionnels d'*EGFR*, il faut un total de 20  $\mu$ l par échantillon testé.

## Protocole : évaluation des mutations de l'*EGFR* par qPCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM

### Points importants avant de commencer

- Assurez-vous que l'opérateur est formé à l'utilisation des instruments de qPCR. Une formation à l'utilisation des instruments peut, si nécessaire, être dispensée lors de l'installation (voir « Informations de commande », page 113).
- Lisez la section « Précautions », page 23 et familiarisez-vous avec l'ensemble des composants du kit avant utilisation.
- Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit doit être utilisé sur un instrument\* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM équipé de la version 2.1 (ou supérieure) de Rotor-Gene AssayManager associée à la version 1.0.0 (ou supérieure) du plug-in Gamma liée au profil du dosage dédié au FFIP ou au plasma.
- Prenez le temps de vous familiariser avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, avec le logiciel Rotor-Gene AssayManager et avec le plug-in Gamma avant de commencer le protocole. Consultez les manuels d'utilisation de l'instrument, de Rotor-Gene AssayManager et du plug-in Gamma pour plus de détails.
- Rotor-Gene AssayManager version 2.1 permet l'interprétation automatisée des résultats de la PCR. Les paramètres du cycle sont verrouillés pour le cycle.
- Si vous utilisez le logiciel Rotor-Gene AssayManager version 2.1, le plug-in Gamma et le profil du dosage pour la première fois, consultez la section « Annexe A : installation du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 et du plug-in Gamma, et importation du profil du dosage » page 106 pour connaître les consignes d'installation. Si le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1, le plug-in Gamma et le profil du dosage sont déjà installés et importés dans votre ordinateur, suivez les consignes ci-dessous.

\* Vérifiez que les instruments et l'équipement ont été contrôlés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

- Si vous utilisez des procédures d'extraction automatisée, consultez la colonne « Validity of result » (Validité des résultats) pour chaque échantillon dans le fichier de résultats du QIA Symphony SP une fois le cycle terminé, voir « Protocole : quantification et normalisation de l'ADNg », page 41.
- Si vous utilisez de l'ADNg extrait à partir d'échantillons FFIP, l'échantillon doit être quantifié et dilué à 5 ng/µl, voir « Protocole : quantification et normalisation de l'ADNg », page 41.
- Si vous utilisez de l'ADNlc extrait à partir de plasma, les échantillons doivent être utilisés non dilués.

## Configuration de la qPCR

Avec le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, il est recommandé de tester six échantillons d'ADN dans la même expérience pour optimiser l'utilisation des contrôles et des mélanges réactionnels. Mais vous pouvez tester jusqu'à 16 échantillons dans la même expérience.

## Étapes préliminaires

- Laissez le bloc de chargement (72 x 0,1 ml Tubes) refroidir au réfrigérateur (2 à 8 °C).
- Avant chaque utilisation, décongelez tous les composants nécessaires.

**Remarque :** l'étape de décongélation ne doit pas dépasser 1 heure à température ambiante afin d'éviter toute dégradation du matériel. S'il vous faut plus de temps, conservez les composants entre 2 et 8 °C jusqu'à 8 heures.

- Nettoyez la zone de la paillasse dédiée à la préparation du mélange pour PCR afin de réduire le risque de contamination de matrice ou de nucléase.
- Vortexez les tubes contenant les contrôles, les mélanges d'amorces et de sondes et le mélange principal pour PCR (3 à 5 secondes) puis centrifugez brièvement avant utilisation.

## Procédure

1. Préparez les quatre mélanges réactionnels pour PCR dans des tubes de 1,5 ml ou 2 ml (non fournis), c.-à-d. mélangez chaque mélange d'amorces et de sondes (T790M & L861Q, insertions & G719X, L858R & C797S ou délétions & S768I) avec le mélange principal pour PCR selon le nombre d'échantillons à traiter.

Le volume requis pour chaque composant du kit afin de réaliser les mélanges réactionnels figure dans le Tableau 4. Le volume réactionnel final pour PCR est de 25 µl après ajout de 5 µl d'échantillon d'ADN ou de matrice de contrôle du cycle. Un volume supplémentaire est inclus pour compenser toute erreur de pipetage et permettre la préparation d'un mélange réactionnel suffisant pour le nombre prévu d'échantillons de test et de contrôles, p. ex. six échantillons plus deux contrôles.

**Tableau 4. Préparation de mélanges réactionnels**

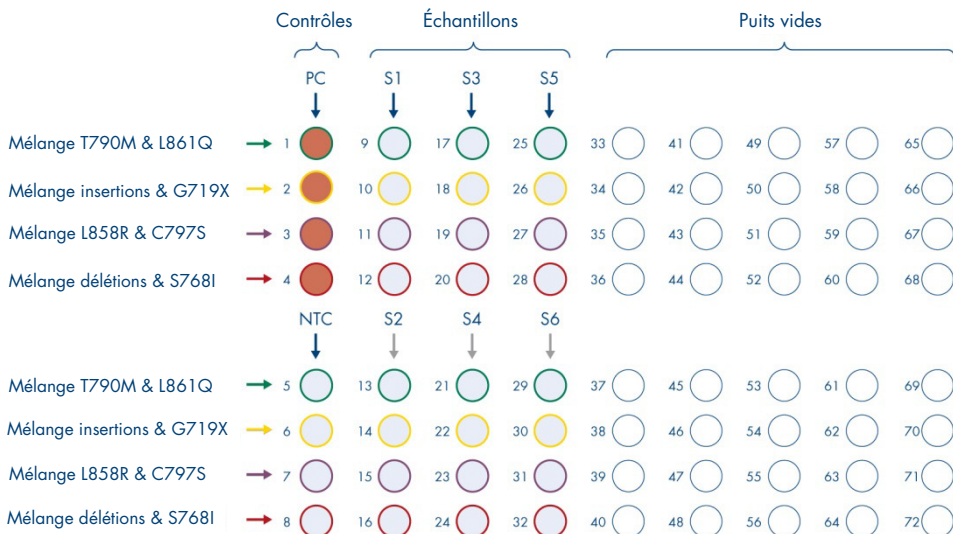
Composant	1 réaction (µl)	8 + 1 réactions (µl)*
Mélange d'amorces et de sondes EGFR	7,5	67,5
Mélange principal PCR	12,5	112,5
Volume total du mélange réactionnel	20	180
Distribution du mélange réactionnel	20 µl par tube	
Distribution de l'échantillon de test	5 µl par tube	
<b>Volume total par réaction</b>	<b>25 µl</b>	


\* Un volume réactionnel supplémentaire est inclus pour compenser les erreurs de pipetage : un puits supplémentaire pour 10 puits maximum et deux puits supplémentaires pour 20 puits maximum.

2. Remettre tous les composants du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit au congélateur afin d'éviter toute dégradation du matériel.
3. Vortexez les mélanges réactionnels 3 à 5 secondes puis centrifugez-les brièvement.

4. Placez les tubes en barrettes de PCR sur un bloc de chargement (72 x 0,1 ml Tubes) refroidi puis distribuez 20 µl de mélanges réactionnels *EGFR* par tube en barrette en suivant la configuration du bloc de chargement indiquée sur la Figure 6.

**Remarque :** il est recommandé de distribuer les 20 µl du mélange réactionnel par pipetage inverse.



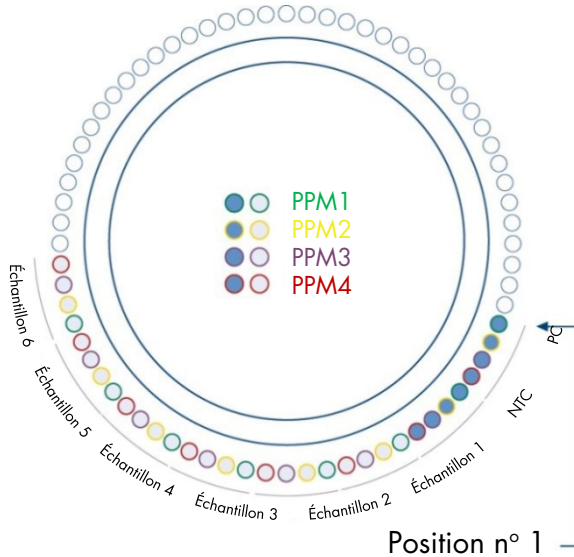
**Figure 6. Configuration du bloc de chargement pour une expérience avec le *therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit*, pour tester six échantillons.** Les positions 1 à 32 sont les suivantes. PC : contrôle positif *EGFR* ; NTC : contrôle sans matrice (eau) ; échantillon 1 (S1) à échantillon 6 (S6) : échantillons d'ADN. Mélanges réactionnels : mélange T790M & L861Q *EGFR*, mélange insertions & G719X *EGFR*, mélange L858R & C797S *EGFR*, mélange délétions & S768I *EGFR*. Toutes les autres positions  sont des puits vides.


**Remarque :** vous pouvez analyser les échantillons d'ADN FFIP et plasma au cours de la même expérience. Cela nécessite d'exécuter les profils du dosage FFIP et plasma dans la même expérience et avec une disposition de plaque spécifique. Consultez l'Annexe B : exécution des profils du dosage FFIP et plasma dans la même expérience (page 110) pour plus de détails.

5. Ajoutez 5 µl d'eau pour contrôle sans matrice dans les tubes NTC désignés (Figure 6) pour obtenir un volume total de 25 µl. Mélangez délicatement par aspiration-refoulement avec la pipette. Fermez tous les tubes contenant le NTC.
6. Vortexez et centrifugez brièvement les échantillons d'ADN et le contrôle positif (CP) *EGFR*. Ajoutez ensuite 5 µl d'échantillon ou de matrice de CP dans les tubes correspondants (Figure 6) pour obtenir un volume total de 25 µl. Mélangez délicatement par aspiration-refoulement avec la pipette.
7. Fermez tous les tubes et vérifiez l'absence de bulles au fond des tubes.  
**Remarque** : changez de pointe entre chaque ajout de matrice pour éviter toute contamination.

## Protocole : préparation de l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

8. Placez un 72-Well Rotor sur le Rotor Holder de l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. Remplissez le rotor de tubes en barrettes conformément aux positions attribuées, en commençant à la position 1 comme indiqué sur la Figure 7.  
**Remarque** : veillez à ce que le premier tube soit inséré dans la position 1 et que l'orientation et la position des tubes soient correctes, comme indiqué.
10. Toutes les positions non utilisées doivent être remplies par des tubes en barrettes vides et bouchés.  
**Remarque** : nous recommandons de laisser les quatre contrôles positifs dans les positions 1 à 4 et les quatre contrôles sans matrice dans les positions 5 à 8 car l'analyse automatisée définie dans les profils du dosage est basée sur cette disposition. Une disposition différente risque d'entraîner des résultats aberrants ou non valides.



**Figure 7. Configuration du rotor pour une expérience avec le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit.** À partir de la position 1 PC : contrôle positif EGFR ; NTC : contrôle sans matrice (eau) ; PPM 1 : mélange T790M & L861Q EGFR ; PPM 2 : mélange insertions & G719X EGFR ; PPM 3 : mélange L858R & C797S EGFR ; PPM 4 : mélange délétions & S768I EGFR ; échantillon 1 à échantillon 6 : échantillons d'ADN. Remarque : toutes les autres positions  doivent être remplies par des tubes vides.

11. Fixez la bague de verrouillage.
12. Chargez le rotor muni de la bague de verrouillage sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Fermez le couvercle de l'instrument.

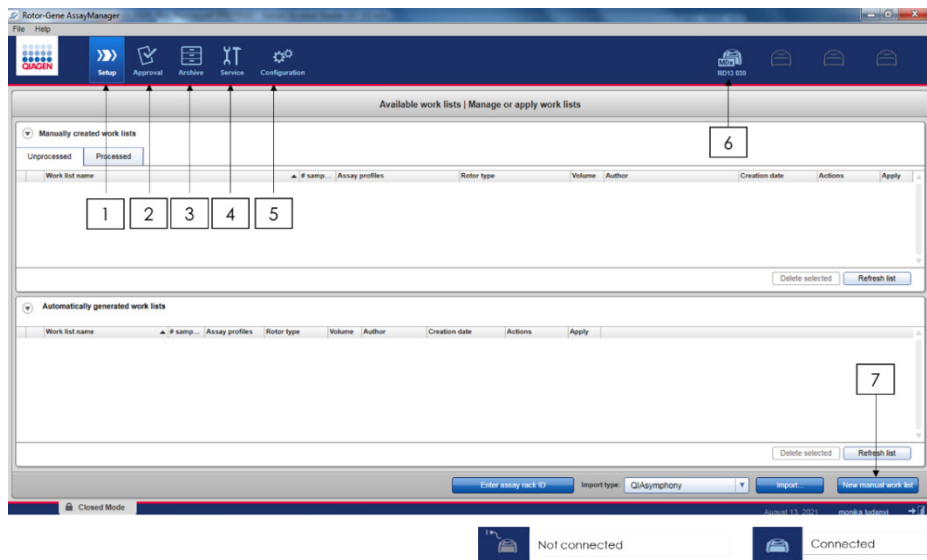
Créer une liste de tâches et commencer un cycle de qPCR

**Remarque :** la liste de tâches peut être créée et enregistrée avant de préparer les échantillons ou lorsque l'expérience est configurée sur l'instrument, comme stipulé dans ce manuel.

13. Mettez sous tension l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.



14. Lancez le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1.
15. Connectez-vous en tant qu'utilisateur avec le rôle Operator (Opérateur) en mode fermé. Cliquez sur OK. La fenêtre suivante apparaît.

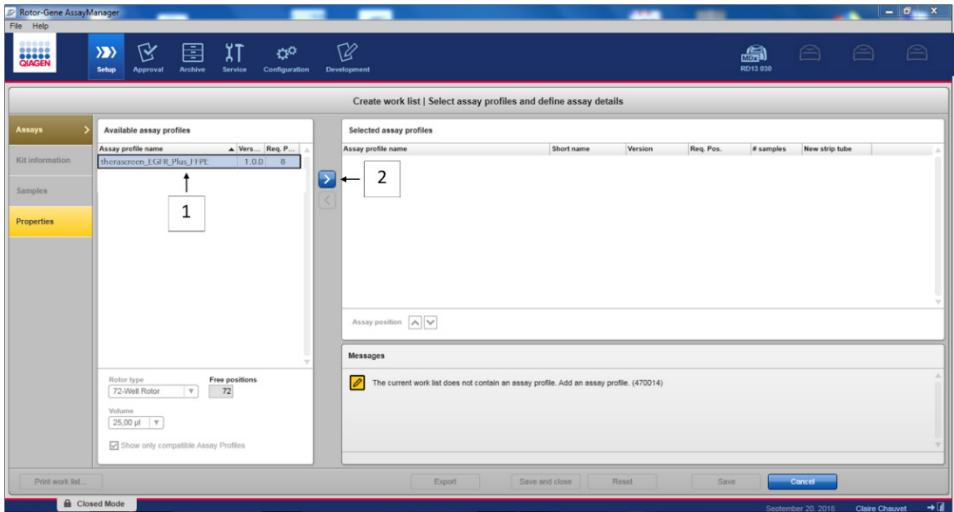


**Figure 8. Rotor-Gene AssayManager v2.1.** 1 = Onglet Setup (Paramétrage). Cet onglet permet de gérer ou d'appliquer des listes de tâches 2= Onglet Approval (Approbation). Cet onglet permet de trouver les expériences précédentes. 3 = Onglet Archive. Cet onglet permet de trouver les expériences précédentes approuvées. 4 = Onglet Service. Sous cet onglet, vous trouvez une piste d'audit pour chaque fichier généré par le logiciel. 5 = Onglet Configuration. Cet onglet permet de configurer tous les paramètres du logiciel. 6 = Icône de l'instrument Rotor-Gene Q (RGQ), qui indique à l'utilisateur si un cycleur spécifique est connecté. Il est possible de connecter jusqu'à quatre instruments RGQ à un même ordinateur. 7 = New manual work list (Nouvelle liste de tâches manuelle).

16. Vérifiez que le RGQ est correctement détecté par le logiciel avant de lancer le cycle. Pour plus d'informations, consultez la section « Environnement Cycleur » dans le *Manuel d'utilisation de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.
17. Cliquez sur New manual work list (Nouvelle liste de tâches manuelle) dans le gestionnaire de listes de tâches (environnement « Setup » [Paramétrage]) (Figure 8).

18. Sélectionnez le profil du dosage EGFR qui convient dans la liste des profils du dosage disponibles :

- Pour tester les échantillons d'ADNg à partir de FFIP : `therascreen_EGFR_Plus_FFPE`
- Pour tester les échantillons d'ADNlc à partir de plasma : `therascreen_EGFR_Plus_Plasma`



**Figure 9. Sélection d'un profil du dosage.** 1 = Profils du dosage disponibles ; 2 = Transfert des profils du dosage vers la liste de tâches

**Remarque :** Il est possible d'exécuter les profils du dosage FFIP et plasma dans la même expérience. Consultez l'Annexe B : exécution des profils du dosage FFIP et plasma dans la même expérience, page 110, pour plus de détails.

19. Cliquez sur **Move** (Déplacer) pour transférer le profil du dosage sélectionné vers la liste **Selected assay profiles** (Profils du dosage sélectionnés).

20. Saisissez le nombre d'échantillons dans le champ correspondant.

Selected assay profiles						
Assay profile name	Short name	Version	Req. Pos.	# samples	New strip tube	
therascreen_EGFR_Plus_FFPE	FFPE	1.0.0	8	3	<input checked="" type="checkbox"/>	

Figure 10. Création de la liste de tâches : définition des détails du dosage. 3 = Nombre d'échantillons

**Remarque :** le nombre d'échantillons ne correspond pas au nombre de tubes et n'inclut pas les contrôles.

21. Sélectionnez l'onglet « Kit Information » (Informations sur le kit). Saisissez les informations suivantes sur le kit d'EGFR, elles figurent sur l'étiquette apposée sur la boîte du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit :

- Numéro de matériel : 1114551
- Date de péremption valide
- Numéro de lot

Figure 11. Création de la liste de tâches : modifier les informations sur le kit. 4 = Kit bar code (Code-barres du kit). Cet onglet indique le code-barres du kit (s'il est saisi, les autres champs sont remplis automatiquement). 5 = Material number (Numéro de matériel). 6 = Kit expiry date (Date de péremption du kit). 7 = Lot number (Numéro de lot). Ces informations figurent sur la boîte du kit.

**Remarque :** tous les champs doivent être remplis, ils deviennent bleus si les informations saisies sont valides.

22. Sélectionnez l'onglet « Samples » (Échantillons). Une liste contenant les détails des échantillons apparaît. Cette liste représente la disposition attendue du rotor.
23. Saisissez l'identifiant des échantillons dans la liste ainsi que les éventuelles informations facultatives sur les échantillons sous forme de commentaire pour chacun d'eux.

Pos.	Style	Sample ID	Status	Sample type	Targets	Assay	Sample comment
1	█	Positive Control		PC	T790M, L861Q,...	FFPE	
2					Insertions, G719X,...		
3					L858R, C797S,...		
4					Deletions, S768I,...		
5	█	NTC		NTC	T790M, L861Q,...	FFPE	
6					Insertions, G719X,...		
7					L858R, C797S,...		
8					Deletions, S768I,...		
9	█	Sample 1		Test	T790M, L861Q,...	FFPE	9
10					Insertions, G719X,...		
11					L858R, C797S,...		
12					Deletions, S768I,...		
13	█	Sample 2		Test	T790M, L861Q,...	FFPE	
14					Insertions, G719X,...		
15					L858R, C797S,...		
16					Deletions, S768I,...		
17	█	Sample 3		Test	T790M, L861Q,...	FFPE	
18					Insertions, G719X,...		
19					L858R, C797S,...		
20					Deletions, S768I,...		
21	█	Sample 4		Test	T790M, L861Q,...	FFPE	

**Figure 12. Saisie des informations sur l'échantillon.** 8 = ID d'échantillon. 9 = Commentaires sur l'échantillon (facultatif).

24. Sélectionnez Propriétés (Propriétés) puis saisissez un nom de liste de tâches (l'utilisateur peut saisir n'importe quel nom de liste de tâches valide).

The screenshot shows a software interface for creating or editing a work list. On the left is a sidebar with menu items: Assays, Kit information, Samples, and Properties (selected). The main window title is 'Create work list | Edit properties'. The 'Properties' section includes a 'Work list name' text input field with a yellow background, indicated by a box labeled '10' and an arrow. A 'Default name' button is positioned below the text field. The 'Work list' section contains two checkboxes: 'is editable' (checked) and 'work list is complete (can be applied)'. Arrows labeled '12' and '11' point to these checkboxes. Below the checkboxes are four text input fields: 'Created', 'Last modified', 'Last applied', and 'External order ID'.

**Figure 13. Properties (Propriétés).** 10 = Work list name (Nom de la liste de tâches). 11 = Cochez l'option « work list is complete » (la liste de tâches est complète). 12 = Décochez « is editable » (est modifiable)

**Remarque :** la case « **is editable** » (est modifiable) (Figure 13) définit si la liste de tâches est toujours modifiable ou non. Si la liste de tâches est applicable et ne doit plus être modifiée, vous devez décocher cette case.

**Remarque :** la liste de tâches peut être appliquée directement ou être enregistrée et exécutée ultérieurement.

25. Cochez la case **worklist is complete** (can be applied) (la liste de tâches est complète [peut être appliquée]).

26. Enregistrez la liste de tâches.

Facultatif : il est possible d'imprimer la liste de tâches. Cela peut s'avérer utile lors de la préparation et de la configuration de la qPCR. Pour imprimer la liste de tâches, cliquez sur **Print work list** (Imprimer la liste de tâches). Les informations sur l'échantillon sont incluses dans cette liste de tâches.

27. Sélectionnez la liste de tâches correspondante dans le gestionnaire de listes de tâches puis cliquez sur **Apply** (Appliquer). Si la liste de tâches est toujours ouverte, vous pouvez aussi cliquer sur **Apply** (Appliquer).

28. Saisissez le nom de l'expérience dans le champ **Experiment name** (Nom de l'expérience).

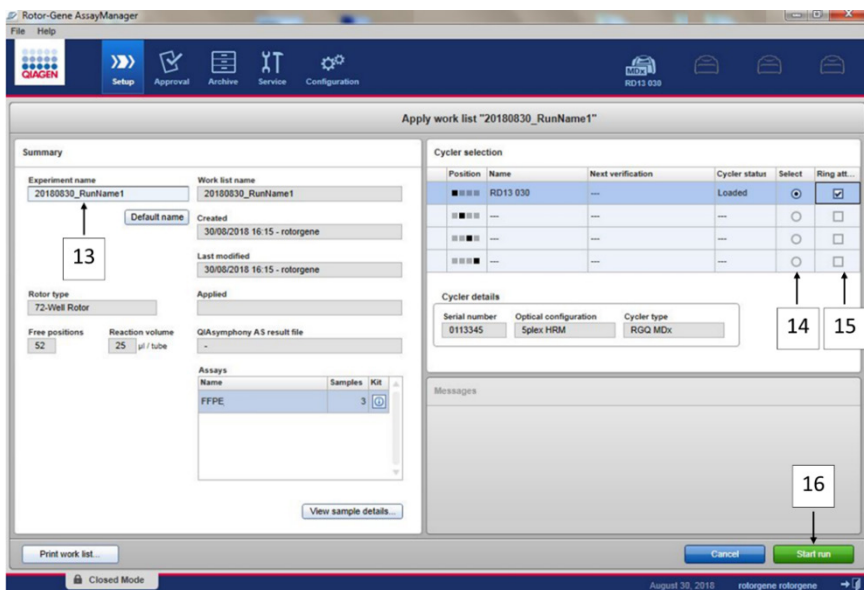
29. Dans la liste **Cycler selection** (Sélection du cycleur), sélectionnez le cycleur à utiliser.

**Remarque** : vous devez utiliser un instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM\*.

30. Veillez à ce que la bague de verrouillage soit correctement fixée puis cochez la case **Ring attached** (Bague fixée).

31. Cliquez sur **Start run** (Démarrer le cycle). Le cycle de qPCR démarre (Figure 14).

\* Dans certains pays, le cas échéant, il est possible d'utiliser l'instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM produit en mai 2011 ou ultérieurement. La date de production peut être déduite du numéro de série à l'arrière de l'instrument. Le numéro de série est affiché au format « mmaannn » où « mm » correspond au mois de production en chiffres, « aa » correspond aux deux derniers chiffres de l'année de production et « nnn » est l'identifiant unique de l'instrument.



**Figure 14. Lancement du cycle.** 13 = Saisissez le nom de l'expérience ; 14 = Sélection du cycleur ; 15 = Confirmez la fixation de la bague de verrouillage ; 16 = Cliquez sur Start run (Démarrer le cycle) pour lancer le cycle.

## Validation et rapport des résultats de la qPCR

La fonctionnalité générale de l'environnement Approval (Approbation) est décrite dans le *Manuel d'utilisation de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

Une fois le cycle achevé et le cycleur libéré, l'expérience sera conservée dans la base de données interne. L'analyse des données acquises s'effectue automatiquement en fonction du module d'extension correspondant au profil du dosage et des règles et valeurs de paramètre définies dans ce profil.

32. Une fois le cycle achevé, cliquez sur **Finish run** (Terminer le cycle) (Figure 15).

**Remarque :** tant que cette étape n'est pas terminée, l'expérience n'est pas sauvegardée dans la base de données interne.

### 33. Validez et approuvez le cycle.

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

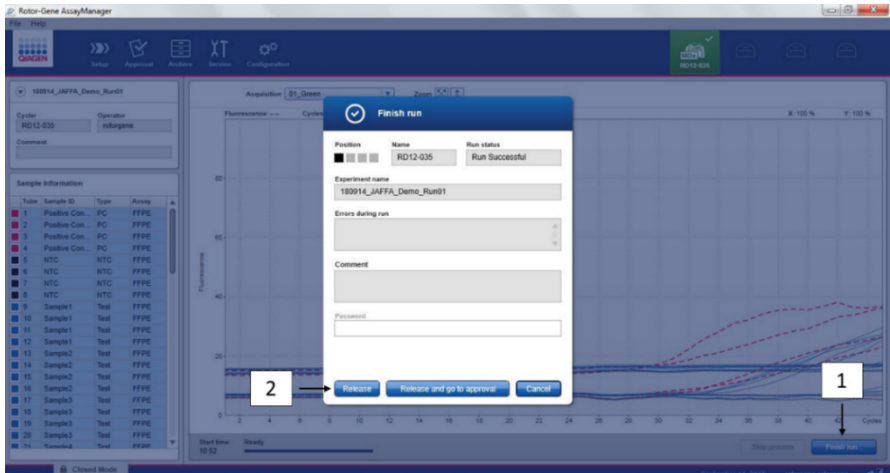


Figure 15. Fin du cycle. Finish run (Terminer le cycle) (1) puis Release run (Valider le cycle) (2)

### 34. Validez les résultats.

- Si vous avez cliqué sur **Release and go to approval** (Valider et passer à l’approbation), les résultats de l’expérience s’affichent dans l’environnement Approval (Approbation).
- Si vous avez cliqué sur **Release** (Valider) avec un rôle d'utilisateur, l'utilisateur ayant un rôle Approver (Approbateur) doit se connecter et sélectionner l’environnement Approval (Approbation).

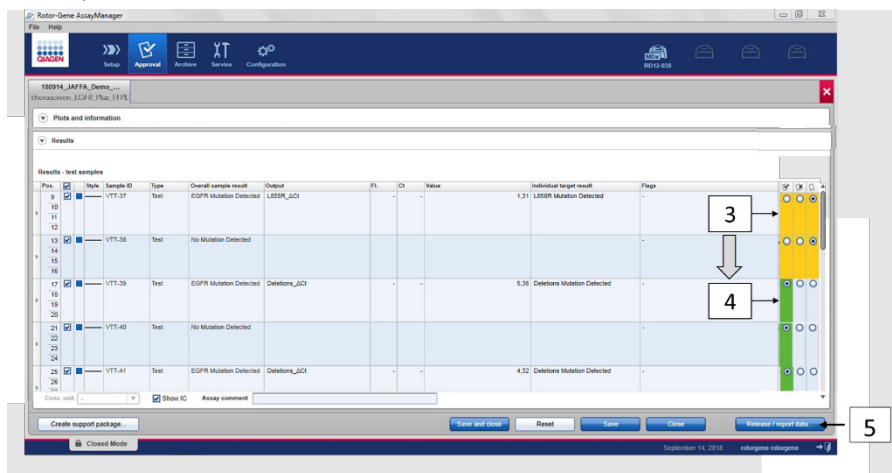
### 35. Filtrez le dosage à approuver en sélectionnant les options de filtrage puis en cliquant sur **Apply** (Appliquer). Sélectionnez le dosage souhaité dans la liste des dosages filtrés à l’aide de la case à cocher puis cliquez sur **Start Approval** (Démarrer l’approbation).



36. Utilisez les boutons radio (Figure 16) pour accepter ou rejeter des échantillons.

**Remarque** : des échantillons peuvent être rejetés en cas d'erreur de manipulation par l'opérateur ou de courbes inhabituelles (artefact).

37. Examinez les résultats et cliquez sur **Release/Report data** (Valider/Communiquer les données).



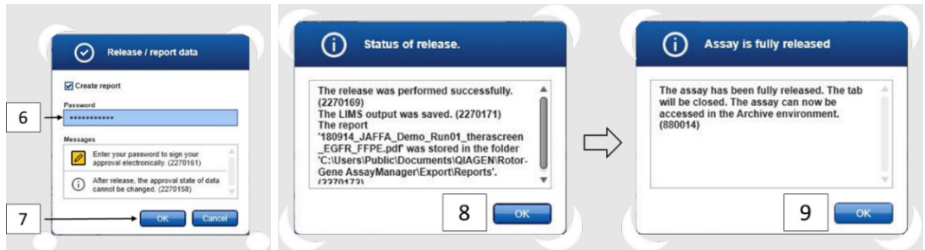
**Figure 16. Examen et validation des données.** Examinez et acceptez (ü) ou rejetez (û) les résultats pour chaque échantillon : la couleur de la case passe du jaune au vert, p. ex., si les données sont approuvées (3, 4). Cliquez ensuite sur « Release / report data » (Valider/Communiquer les données) (5).

38. Saisissez un mot de passe si nécessaire puis cliquez sur OK. Le rapport est généré au format .pdf et enregistré automatiquement dans le dossier prédéfini. Le chemin d'accès du dossier par défaut est **C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Export\Reports**.

**Remarque** : vous pouvez changer le chemin d'accès et le dossier dans l'environnement Configuration.

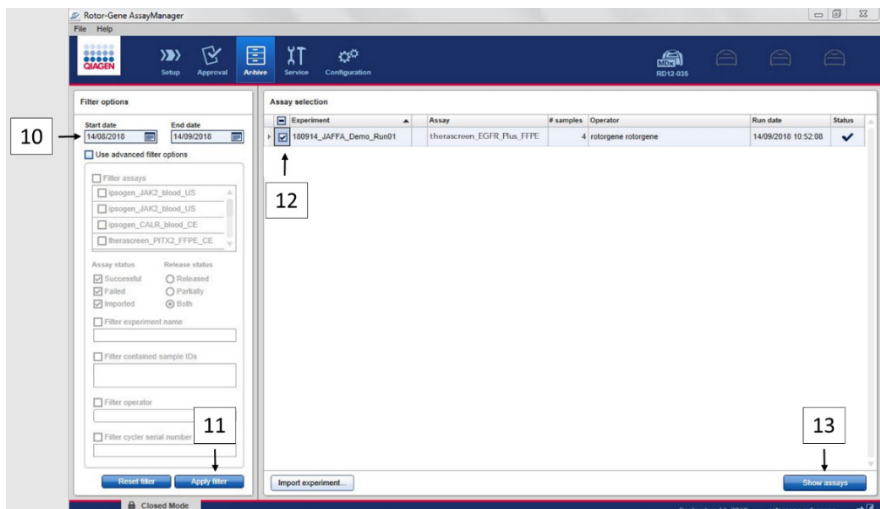
**Remarque** : en même temps, un fichier du SGIL est automatiquement créé et enregistré dans le dossier prédéfini. Le chemin d'accès du dossier par défaut est **C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Export\LIMS**

39. Fermez le fichier pdf et revenez à Rotor-Gene AssayManager. Cliquez sur **OK** pour chaque invite.



**Figure 17. Valider/Communiquer les données.** Saisissez le mot de passe (6) puis cliquez sur OK (7). Un rapport PDF est généré et s'ouvre, fermez-le : un fichier du SGIL est automatiquement généré et une indication de validation apparaît, cliquez sur OK (8). Le dosage est à présent parfaitement validé : cliquez sur OK pour aller à l'environnement Archive (9).

40. Allez à l'onglet « Archive » pour exporter le fichier .rex correspondant aux données brutes. Retrouvez votre expérience en utilisant les options de filtrage puis cliquez sur « Show assays » (Afficher les dosages) (Figure 18)



**Figure 18. Sélection de votre expérience dans l'environnement Archive.** Par exemple, filtrez par date (10) et appliquez le filtre (11). Sélectionnez l'expérience (12) puis cliquez sur « Show assays » (Afficher les dosages) (13).

41. Cliquez sur **Export .rex file** (Exporter le fichier .rex) puis sur **OK** pour enregistrer.

**Remarque** : vous pouvez choisir l'emplacement sur lequel enregistrer le fichier .rex (le chemin d'accès par défaut est **C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Export\ExperimentsforClosedMode**). Vous pouvez changer le chemin d'accès et le dossier sous l'onglet « Specify the .rex file export destination » (Spécifier la destination d'exportation du fichier .rex).

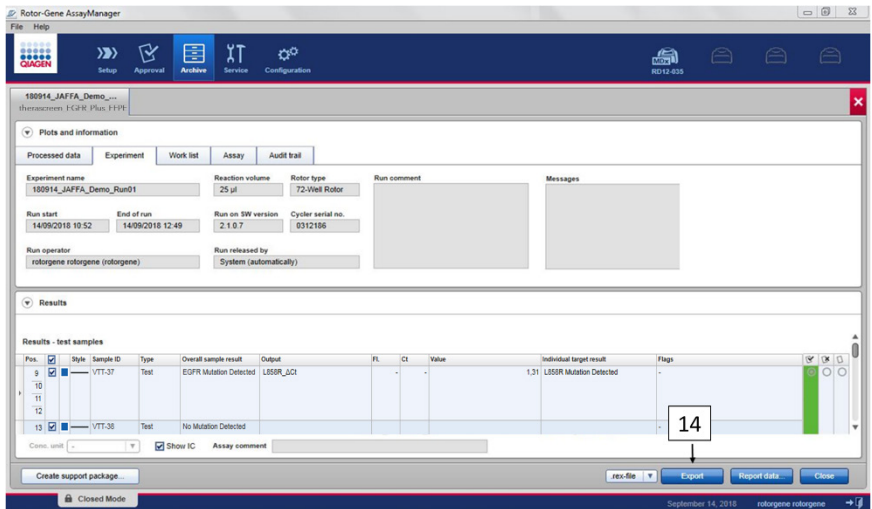


Figure 19. Exportez le fichier .rex en cliquant sur le bouton « Export » (Exporter) (14).

**Remarque** : pour obtenir une assistance de dépannage auprès de l'assistance technique de QIAGEN, il est nécessaire de disposer d'un package de support provenant du cycle. Il est possible de générer des packages de support dans l'environnement Approval (Approbation) ou Archive. Pour plus d'informations, consultez la section « Création d'un package de support » dans le *Manuel d'utilisation de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

---

En plus du package de support, il pourra être utile de disposer de la piste d'audit à partir de l'incident à  $\pm 1$  jour. La piste d'audit peut être récupérée dans l'environnement Service. Pour plus d'informations, consultez le *Manuel d'utilisation de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

42. Déchargez l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM et mettez les tubes en barrettes au rebut conformément aux réglementations de sécurité locales.

# Interprétation des résultats [le cas échéant]

L'analyse des résultats du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit pour chaque contrôle et chaque échantillon est effectuée automatiquement par le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 associé au plug-in Gamme v1.0 et aux profils du dosage EGFR.

Les profils du dosage EGFR analysent les courbes d'amplification et peuvent invalider des courbes non conformes, en fonction de leur forme et de l'amplitude du bruit. Si tel est le cas, un indicateur est associé à la courbe invalidée (voir Tableau 6, page 65).

## Contrôles

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyse les contrôles du cycle :

- L'absence d'amplification spécifique est vérifiée dans le NTC.
- La validité du contrôle positif est basée sur la conformité des valeurs de CT aux spécifications prédéfinies.
- Si l'un de ces contrôles du cycle n'est pas conforme, l'indicateur « ASSAY\_INVALID » apparaît. Si cet indicateur apparaît, le cycle est considéré comme non valide et vous devez recommencer l'expérience (le schéma de décision pour de nouveaux tests est présenté sur la Figure 20).
- **Remarque** : le rapport généré à la fin du cycle indique les résultats obtenus pour les contrôles du cycle, et les indicateurs de non-validité (voir le Tableau 6, page 65) apparaissent en regard des données non valides.

Si tous les contrôles du cycle sont conformes, Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyse les échantillons de test. Les échantillons d'ADN FFIP et plasma sont analysés en suivant le même processus mais avec des critères spécifiques consignés dans les profils du dosage correspondants.

## Échantillons

### Contrôle interne de l'exon 2

La validité du contrôle interne de l'exon 2 est basée sur la conformité des valeurs de Ct aux spécifications prédéfinies. Le contrôle interne doit être valide pour que les résultats des échantillons puissent être interprétés. Un contrôle interne valide révèle une quantité et une qualité d'ADN suffisantes ainsi que l'absence de substances interférentes. En cas de non-validité, consultez le schéma de décision présenté sur la Figure 20.

### Détection des mutations d'EGFR

La présence ou l'absence de mutations d'EGFR dans chaque échantillon de test est évaluée, au regard des valeurs delta Ct entre l'amplification du mutant et l'amplification du contrôle interne (cible T790M\_ΔCt, L861Q\_ΔCt, etc.) pour les échantillons FFIP et au regard de l'amplification du mutant pour les échantillons de plasma (CT).

### Semi-quantification des mutations d'EGFR

Une estimation semi-quantitative de la concentration de mutation dans l'ADNlc issu du plasma est fournie pour les cibles concernées (indiquées sous Résumé et explications) sous forme de limites inférieure et supérieure d'intervalle. Le nombre de copies de mutant par millilitre de plasma est estimé, autrement dit les limites inférieure et supérieure d'intervalle sont indiquées par cibles T790M\_CN\_LL, L861Q\_CN\_LL, etc.

Les résultats pour chaque cible sont affichés dans la colonne **Result** (Résultat) du rapport.

La conclusion de l'analyse pour chaque échantillon apparaît dans la colonne **Overall Sample Result** (Résultat global de l'échantillon) du rapport (Tableau 5).

**Tableau 5. Résultats globaux des échantillons et actions**

Résultat global de l'échantillon	Type d'échantillon	Description	Action
Valid (Valide)	Contrôle (Contrôle positif, NTC)	Le contrôle est valide	S. O.
Invalid (Non valide)*	Contrôle (Contrôle positif, NTC)	Le contrôle n'est pas valide (Valeur de CT hors de la plage d'acceptation prédéfinie)	Répétez tout le cycle (les quatre mélanges réactionnels EGFR, tous les échantillons)
EGFR Mutation Detected (Mutation d'EGFR détectée)**	Échantillon de test	Au moins une mutation d'EGFR a été détectée†	S. O.
No Mutation Detected (Aucune mutation détectée)**	Échantillon de test	Aucune mutation d'EGFR n'a été détectée	S. O.
Invalid (Non valide) (associé à l'indicateur ASSAY_IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE)‡	Échantillon de test	La valeur de CT détectée est inférieure à la plage d'acceptation pour le contrôle interne. La quantité d'ADN est peut-être trop importante.	Diluez l'échantillon avant le nouveau test.  Testez de nouveau les échantillons concernés avec les quatre mélanges réactionnels EGFR dans un nouveau cycle de qPCR.
Invalid (Non valide) (associé à l'indicateur ASSAY_IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE)‡	Échantillon de test	La valeur de CT détectée est supérieure à la plage d'acceptation pour le contrôle interne. Il est possible que l'échantillon ne contienne pas suffisamment d'ADN amplifiable ou qu'il contienne un inhibiteur.	Testez de nouveau les échantillons concernés avec les quatre mélanges réactionnels EGFR dans un nouveau cycle de qPCR.  Si l'échantillon avait déjà fait l'objet d'un nouveau test, répétez l'étape d'extraction puis testez-le de nouveau dans un nouveau cycle de qPCR.  Si vous suspectez la présence d'un inhibiteur, essayez de diluer l'échantillon avant le nouveau test (pour le plasma uniquement).  Pour plus d'informations, consultez le Tableau 6 page 65.

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

**Tableau 5. Résultats globaux des échantillons et actions (suite)**

Résultat global de l'échantillon	Type d'échantillon	Description	Action
Invalid (Non valide) (associé à l'indicateur ASSAY_IC_NO_CT_VALUE)*	Échantillon de test	Aucun signal détecté pour le contrôle interne.	Testez de nouveau les échantillons concernés avec les quatre mélanges réactionnels EGFR dans un nouveau cycle de qPCR.
Invalid (Non valide) (autre)	Échantillon de test	Non-validité due à une anomalie de courbe ou à une autre cause (voir le Tableau 6, page 65)	Si l'échantillon avait déjà fait l'objet d'un nouveau test, répétez l'étape d'extraction puis testez-le de nouveau dans un nouveau cycle de qPCR.  Si vous suspectez la présence d'un inhibiteur, essayez de diluer l'échantillon avant le nouveau test (pour le plasma uniquement).  Pour plus d'informations, consultez le Tableau 6 page 65.

\* Lorsque les contrôles ne sont pas valides, les valeurs de CT non valides apparaissent entre crochets pour information.

\*\* Pour les mutations concernées par le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit (figurant dans le Tableau 1)

† Pour l'identification des mutations d'EGFR détectées, consultez les cibles  $\Delta Ct$  (p. ex. T790M\_ΔCt), dans la colonne des résultats cibles (p. ex. T790M détecté). Pour les résultats de semi-quantification (nombre de copies par millilitre de plasma pour l'ADNlc), consultez les cibles X\_CN\_LL et X\_CN\_UL (où X = nom de la mutation), dans la colonne des valeurs, pour obtenir les limites inférieure et supérieure de l'intervalle de semi-quantification.

**Remarque :** & ASSAY représente

T790M\_L861Q/INSERTIONS\_G719X/L858R\_C797S/DELETIONS\_S768I

## Indicateurs

Les résultats non valides s'accompagnent d'indicateurs affichés dans la colonne **Flag** (Indicateur) du rapport de Rotor-Gene AssayManager.

Les indicateurs d'échantillon de non-validité qui peuvent être attribués à un échantillon ou une cible au cours de l'analyse de Rotor-Gene AssayManager v2.1, sont définis dans le Tableau 6. Pour les indicateurs universels inclus dans le plug-in Gamma, reportez-vous également au *Manuel d'utilisation de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.



**Tableau 6. Définition des indicateurs**

Indicateur	Description
ANALYSIS_FAILED	Le dosage est défini comme non valide car l'analyse a échoué. Contactez les services techniques QIAGEN.
ASSAY_INVALID	L'échantillon n'est pas valide car au moins un contrôle externe n'est pas valide.
CONSECUTIVE_FAULT	Une cible utilisée pour le calcul de cette cible n'est pas valide.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	La courbe d'amplification des données brutes présente une forme qui s'écarte du comportement établi pour ce dosage. La probabilité de résultats incorrects ou d'une mauvaise interprétation est élevée.
FLAT_BUMP	La courbe d'amplification présente une bosse plate qui s'écarte du comportement établi pour ce dosage. La probabilité de résultats incorrects ou d'une mauvaise interprétation est élevée (p. ex. détermination incorrecte de la valeur de $C_T$ ).
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	La variation du pourcentage de fluorescence pour cet échantillon, par rapport au tube à échantillon présentant la variation de fluorescence la plus élevée, est inférieure à la limite définie.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	La courbe d'amplification franchit la valeur seuil plusieurs fois. Il est impossible de déterminer une valeur de $C_T$ sans ambiguïté.
TARGET_NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE*	Un signal non valide a été détecté dans le contrôle sans matrice.
OTHER_TARGET_INVALID	Une autre cible du même échantillon n'est pas valide.
ASSAY_IC_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE& ASSAY_IC_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE&	La valeur de $C_T$ détectée est hors de la plage d'acceptation pour le contrôle interne dans le tube de contrôle positif.
ASSAY_IC_PC_NO_CT_VALUE&	Aucun signal n'a été détecté pour le contrôle interne dans le tube de contrôle positif.
TARGET_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE** TARGET_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE**	La valeur de $C_T$ détectée est hors de la plage d'acceptation pour le dosage de mutation dans le tube de contrôle positif.

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

**Tableau 6. Définition des indicateurs (suite)**

Indicateur	Description
TARGET_PC_NO_CT_VALUE**	Aucun signal n'a été détecté pour le canal cible dans le tube de contrôle positif.
RUN_FAILED	Le dosage non valide est défini comme non valide en raison d'un problème avec le cycleur ou la connexion du cycleur.
RUN_STOPPED	Le dosage non valide est défini comme non valide car le cycle a été arrêté manuellement.
ASSAY_IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE&	La valeur de $C_T$ détectée est inférieure à la plage d'acceptation pour le contrôle interne dans un échantillon de test. Il se peut que la quantité d'ADN soit trop importante : diluez l'échantillon avant le nouveau test.
ASSAY_IC_NO_CT_VALUE&	Aucun signal n'a été détecté pour le contrôle interne dans un échantillon de test.
ASSAY_IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	La valeur de $C_T$ détectée est supérieure à la plage d'acceptation pour le contrôle interne dans un échantillon de test. Il est possible que l'échantillon ne contienne pas suffisamment d'ADN amplifiable ou qu'il contienne un inhibiteur.
SATURATION	La fluorescence des données brutes présente une forte saturation avant le point d'inflexion de la courbe d'amplification.
SPIKE	Un pic dans la fluorescence des données brutes est détecté dans la courbe d'amplification, mais en dehors de la région de détermination de la valeur de $C_T$ .
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Un pic est détecté dans la courbe d'amplification à proximité de la valeur de $C_T$ .
NO_BASELINE	Aucune ligne de base initiale n'a été trouvée. L'analyse suivante ne peut pas être effectuée.
STEEP_BASELINE	Une augmentation brutale de la ligne de base dans la fluorescence des données brutes est détectée dans la courbe d'amplification.
STRONG_BASELINE_DIP	Une chute brutale de la ligne de base de la fluorescence des données brutes est détectée dans la courbe d'amplification.

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

**Tableau 6. Définition des indicateurs (suite)**

Indicateur	Description
STRONG_NOISE	Détection d'un bruit de fond élevé en dehors de la phase de croissance de la courbe d'amplification.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Détection d'un bruit de fond élevé dans la phase de croissance (exponentielle) de la courbe d'amplification.
TARGET_ΔCT_UNEXPECTED_EARLY_CT**	La valeur de $\Delta C_T$ détectée est plus faible que prévu pour le mélange réactionnel mutant cible d'un échantillon de test.
TARGET_CT_UNEXPECTED_EARLY_CT**	La valeur de $C_T$ détectée est plus faible que prévu pour le mélange réactionnel mutant cible d'un échantillon de test.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Une ondulation de ligne de base dans la fluorescence des données brutes est détectée dans la courbe d'amplification.

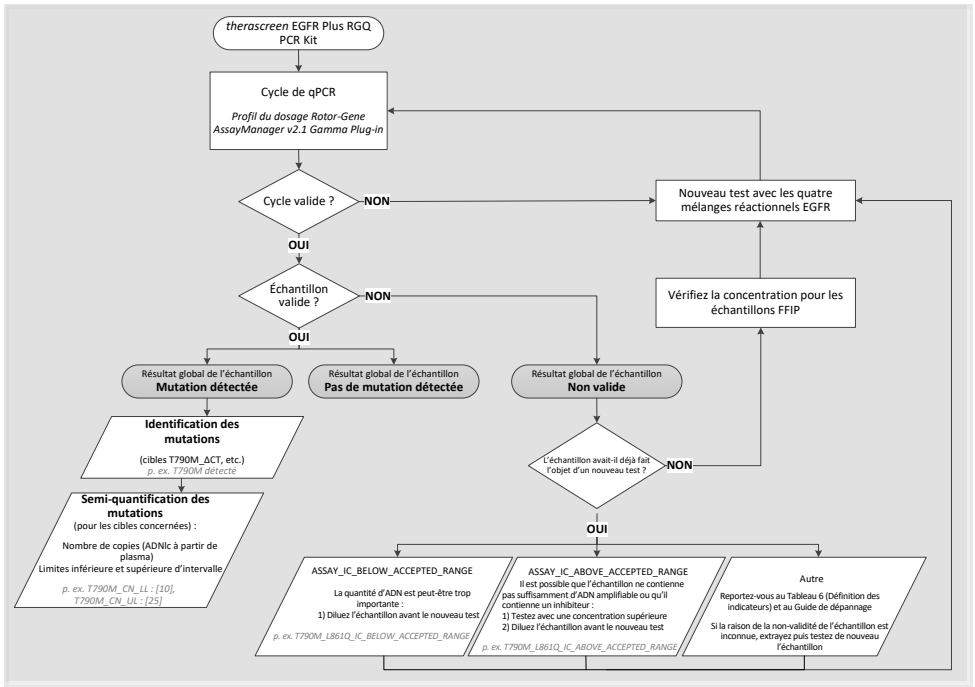
\* TARGET représente T790M, L861Q, T790M\_L861Q\_IC, INSERTIONS, G719X, INSERTIONS\_G719X\_IC, L858R, C797S, L858R\_C797S\_IC, DELETIONS, S768I, DELETIONS\_S768I\_IC

\*\* TARGET représente T790M, L861Q, INSERTIONS, G719X, L858R, C797S, DELETIONS, S768I & ASSAY représente T790M\_L861Q/INSERTIONS\_G719X/L858R\_C797S/DELETIONS\_S768I

## Nouveaux tests

En cas de résultats non valides, consultez le « Guide de dépannage », page 97, pour rechercher la cause de l'échec et identifier toute erreur potentielle à corriger.

La procédure pour les nouveaux tests est résumée sur la Figure 20.



**Figure 20. Schéma de décision du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit.**

Si un ou plusieurs contrôles de cycle ne sont pas valides, vous devez répéter le cycle avec les 4 mélanges réactionnels EGFR. Par exemple, si le contrôle positif ne répond pas aux critères de validité pour le mélange T790M & L861Q mais est valide pour tous les autres mélanges réactionnels EGFR, vous devez tester de nouveau les quatre mélanges avec tous les échantillons.

Si un ou plusieurs échantillons ne sont pas valides, vous devez les tester de nouveau avec les 4 mélanges réactionnels EGFR. Selon l'indicateur affiché par le RGAM, diluez votre échantillon avant le nouveau test ou testez-le de nouveau à une concentration supérieure.

Si la raison de la non-validité de l'échantillon est inconnue :

- 
- Assurez-vous que vos échantillons ont bien été manipulés et conservés comme indiqué dans la section « Conservation et manipulation des échantillons ».
  - Recommencez l'extraction de votre échantillon FFIP avec davantage de coupes avant le nouveau test.
  - Recommencez l'extraction de votre échantillon FFIP en sélectionnant une zone tumorale plus importante avant le nouveau test.
  - Notez que toutes les performances ont été établies avec un ADN extrait d'échantillon FFIP à 5 ng/µl et/ou 5 µl d'ADNlc pur extrait de plasma.

Pour les autres explications de la non-validité de l'échantillon, reportez-vous au « Guide de dépannage » page 97.

## Limitations

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

Le produit doit être utilisé par des professionnels de laboratoire formés aux procédures de biologie moléculaire, aux procédures de diagnostic *in vitro* et à l'utilisation du système QIASymphony SP, de l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM, de Rotor-Gene AssayManager et du plug-in Gamma.

Le produit doit être utilisé uniquement sur le cycleur de real-time PCR Rotor-Gene Q MDx, série 5plex HRM, associé au logiciel Rotor-Gene AssayManager et au plug-in Gamma avec les profils du dosage *therascreen* EGFR Plus dédiés.

Nous recommandons l'utilisation de la Deparaffinization Solution (y compris le traitement par RNase A), du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, du QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit, du QIASymphony DSP DNA Mini Kit et du QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

Il est impératif de respecter rigoureusement le *Mode d'emploi du theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit* pour obtenir des résultats optimaux. Il n'est pas recommandé de diluer les réactifs d'une manière autre que celle décrite dans ce manuel, cela compromettrait les performances. Tous les réactifs fournis dans le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans le même kit. L'utilisation de réactifs de différents lots de kits dans le même cycle peut compromettre les performances.

Il est important d'évaluer la quantité d'ADNg présent dans l'échantillon FFIP avant de procéder à l'analyse avec le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit. Vous devez répéter la procédure d'extraction si la quantité d'ADNg est insuffisante pour l'analyse des mutations. L'ADNg doit être dilué si la concentration est trop élevée pour l'analyse des mutations.

---

Prêtez attention aux dates de péremption et aux conditions de conservation imprimées sur l'emballage et les étiquettes des composants. N'utilisez pas de composants périmés ou mal conservés.

Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit est validé seulement pour le plasma prélevé dans des échantillons 2K EDTA et FFIP de patients souffrant d'un CPNPC.

Toute utilisation non conforme de ce produit et/ou modification quelconque de l'un de ses composants décharge QIAGEN de toute responsabilité.

# Caractéristiques de performances

## Limite du blanc

La limite du blanc (Limit of Blank, LOB) a été déterminée à l'aide de 77 échantillons FFIP d'EGFR de type sauvage de patients souffrant d'un CPNPC et 75 échantillons de plasma de donneurs sains (au moins 60 mesures par lot de réactifs, 3 lots de *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit utilisés). La LOB a été déterminée pour chaque dosage, comme la valeur LOB la plus faible obtenue. Les résultats de la LOB sont résumés dans le Tableau 7.

**Tableau 7. Résumé des résultats de la limite du blanc pour le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit**

Cible EGFR	LoB FFIP ( $\Delta Ct$ )	LoB plasma ( $\Delta Ct$ )
T790M	11,49	40,23
L861Q	15,31	35,54
Insertions	11,32	38,42
G719X	14,47	45,00
L858R	10,52	37,54
C797S	15,06	45,00
Délétions	14,15	45,00
S768I	14,64	45,00

Le taux de faux positif est inférieur à 1 % pour toutes les cibles EGFR sauf pour L858R dans les échantillons FFIP (1,2 %) et pour les insertions dans les échantillons de plasma (1,08 %)



## Limite de détection

La limite de détection (Limit of Detection, LOD) de chacune des 42 mutations d'EGFR a été déterminée dans des échantillons FFIP et de plasma faiblement positifs pour l'EGFR (3 lots de *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit utilisés). Les résultats de la LOD sont résumés dans le Tableau 8.

**Tableau 8. Résumé des résultats de la limite de détection pour le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit**

Exon	Mutation	COSMIC ID	Changement de base	FFPE	Plasma
				Pourcentage de mutants	Copie par ml
18	G719A	6239	c.2156G>C	5,09 %	794
	G719S	6252	c.2155G>A	35,00 %	149
	G719C	6253	c.2155G>T	1,10 %	161
19	Délétions	26038	c.2233_2247del15	2,02 %	100
		13550	c.2235_2248>AATTC	0,61 %	75
		6223	c.2235_2249del15	0,54 %	75
		6225	c.2236_2250del15	0,74 %	75
		18427	c.2237_2257>TCT	1,00 %	75
		6220	c.2238_2255del18	0,22 %	75
		12367	c.2237_2254del18	0,80 %	75
		12384	c.2237_2255>T	0,36 %	75
		12678	c.2237_2251del15	0,25 %	75
		13551	c.2235_2252>AAT	0,65 %	75
		13552	c.2235_2251>AATTC	1,00 %	75
		12386	c.2237_2252>T	0,78 %	75

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

**Tableau 8. Résumé des résultats de la limite de détection pour le theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit (suite)**

Exon	Mutation	COSMIC ID	Changement de base	FFPE Pourcentage de mutants	Plasma Copie par ml
19	Délétions	12416	c.2237_2253>TTGCT	0,60 %	75
		12728	c.2236_2253del18	0,79 %	75
		12422	c.2238_2248>GC	0,79 %	100
		12382	c.2239_2248TTAAGAGAAG>C	2,99 %	589
		6218	c.2239_2247delTTAAGAGAA	35,00 %	1 100
		12387	c.2239_2258>CA	0,93 %	75
		12370	c.2240_2257del18	0,77 %	75
		12403	c.2239_2256>CAA	0,92 %	75
		6255	c.2239_2256del18	0,16 %	75
		12383	c.2239_2251>C	0,72 %	75
		12419	c.2238_2252>GCA	0,40 %	75
		6210	c.2240_2251del12	0,92 %	75
		23571	c.2238_2252del15	1,10 %	75
		12369	c.2240_2254del15	0,78 %	75
		13556	c.2253_2276del24	0,89 %	75
12385	c.2235_2255>AAT	0,71 %	75		

Suite du tableau page suivante

Suite du tableau de la page précédente

**Tableau 8. Résumé des résultats de la limite de détection pour le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit (suite)**

Exon	Mutation	COSMIC ID	Changement de base	FFPE Pourcentage de mutants	Plasma Copie par ml
20	S768I	6241	c.2303G>T	0,69 %	167
	Insertions	12376	c.2307_2308insGCCAGCGTG	0,76 %	150
		12378	c.2310_2311insGGT	3,04 %	131
		12377	c.2319_2320insCAC	0,64 %	51
		13428	c.2311_2312insGCGTGGACA	0,76 %	100
		13558	c.2309_2310AC>CCAGCGTGGAT	0,89 %	100
	T790M	6240	c.2369C>T	1,80 %	174
	C797Sa	6493937	c.2389T>A	1,11 %	126
	C797Sb	5945664	c.2390G>C	0,62 %	125
21	L858R	6224	c.2573T>G	0,75 %	150
	L861Q	6213	c.2582T>A	0,65 %	43

## Quantité d'ADN

La quantité d'ADNg optimale à utiliser avec le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit a été évaluée avec des échantillons FFIP et de plasma positifs pour l'EGFR pour 9 cibles d'EGFR (T790M, L861Q, G719A, G719C, G719S, L858R, C797Sa, C797Sb et S768I) (3 quantités d'ADNg différentes, 10 mesures par échantillon, 1 lot de *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit utilisé). Les résultats ont montré que la quantité optimale à utiliser est de 25 ng (5 ng/µl).

La quantité d'ADNlc optimale à utiliser avec le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit n'a pas été évaluée avec des échantillons de plasma.

---

## Répétabilité

La répétabilité a été déterminée avec deux échantillons FFIP et de plasma, un positif et un négatif pour l'EGFR. Pour chaque dosage de l'EGFR, la répétabilité a été évaluée sur une mutation donnée de l'EGFR et testée sur 2 niveaux de mutation (moyen et faible). Chaque niveau a été testé en double sur au moins 43 cycles effectués sur 20 jours, avec au moins 78 mesures par niveau de mutation et par dosage (3 instruments Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, 3 opérateurs, 3 lots de *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit utilisés). L'analyse quantitative des résultats de la répétabilité est résumée dans le Tableau 9 pour les échantillons FFIP et dans le Tableau 10 pour les échantillons de plasma.

**Tableau 9. Résumé des résultats de la répétabilité pour le theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit avec des échantillons FFIP**

Mélanges EGFR Plus	Cible EGFR Plus	Niveau de mutation testé	Entre opérateurs différents		Entre instruments différents		Entre lots de kits différents		Entre différents jours		Entre des cycles		Au sein d'un cycle		Total	
			É.-T.*	CV**	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV
T790M_L861Q	T790M	Faible	0,04	0,51	0,11	1,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	4,13	0,17	2,08	0,4	4,84
		Moyen	0,05	1,03	0,14	2,63	0,00	0	0,00	0,00	0,34	6,41	0,18	3,43	0,41	7,8
	L861Q	Faible	0,00	0,00	0,36	8,14	0,00	0,00	0,00	0	0,34	7,63	0,26	5,9	0,56	12,62
		Moyen	0,00	0,00	0,23	11,27	0,03	1,27	0,00	0	0,35	16,92	0,21	10,02	0,47	22,7
	Type sauvage	S. O.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,81	0,00	0	0,4	1,59	0,11	0,45	0,46	1,84
	Ins_G719X	Insertions	Faible	0,15	3,10	0,23	4,55	0,30	6,00	0,00	0	0,64	12,93	0,35	6,97	0,83
Moyen			0,00	0,00	0,23	11,95	0,21	10,79	0,29	15,29	0,49	25,23	0,17	8,59	0,67	34,69
G719X		Faible	0,00	0,00	0,52	9,14	0,48	8,49	0,55	9,7	0,78	13,78	0,27	4,74	1,21	21,5
		Moyen	0,00	0,00	0,49	13,33	0,48	12,82	0,52	14,06	0,63	17,02	0,33	8,84	1,12	30,13
Type sauvage		S. O.	0,00	0,00	0,27	1,05	0,28	1,12	0,21	0,81	0,72	2,83	0,18	2,83	0,86	3,39
L858R_C7975		L858R	Faible	0,00	0,00	0,41	5,76	0,21	2,93	0,43	6,02	0,23	3,25	0,41	5,74	0,79
	Moyen		0,16	3,40	0,38	8,28	0,00	0,00	0,45	9,72	0,24	5,32	0,38	8,29	0,76	16,48
	C7975	Faible	0,00	0,00	0,52	9,13	0,24	4,19	0,00	0	0,22	3,82	0,31	5,35	0,69	12
		Moyen	0,00	0,00	0,35	11,31	0,29	9,23	0,26	8,5	0,36	11,72	0,21	6,69	0,67	21,62
	Type sauvage	S. O.	0,20	0,79	0,29	1,11	0,15	0,59	0,44	1,72	0,4	1,58	0,21	0,83	0,74	2,92
	Del_5768I	Délétions	Faible	0,17	3,10	0,16	2,85	0,00	0,00	0,00	0	0,39	6,95	0,24	4,41	0,51
Moyen			0,20	5,91	0,24	7,14	0,00	0,00	0,00	0	0,42	12,64	0,15	4,53	0,54	16,31
S768I		Faible	0,06	0,74	0,35	4,43	0,35	4,43	0,18	2,32	0,42	5,36	0,25	3,2	0,72	9,18
		Moyen	0,15	2,58	0,27	4,64	0,34	5,82	0,32	5,38	0,31	5,25	0,24	4,17	0,68	11,66
Type sauvage		S. O.	0,00	0,00	0,14	0,56	0,28	1,12	0,26	1,02	0,32	1,26	0,15	0,61	0,54	2,13

\* É.-T. : écart-type

\*\* % CV : coefficient de variation

**Tableau 10. Résumé des résultats de la répétabilité pour le theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit avec des échantillons de plasma**

Mélange EGFR Plus	Cible EGFR Plus	Niveau de mutation testé	Entre opérateurs différents		Entre É.-T. d'instruments		Entre lots de kits différents		Entre différents jours		Entre des cycles		Au sein d'un cycle		Total	
			É.-T.*	% CV**	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV
T790M_L861Q	T790M	Faible	0,1	0,28	0	0	0,16	0,46	0	0	0,29	0,8	0,45	1,27	0,57	1,6
		Moyen	0,16	0,49	0	0	0,12	0,36	0	0	0,26	0,79	0,24	0,73	0,41	1,23
	L861Q	Faible	0,24	0,76	0,3	0,96	0,2	0,63	0,38	1,23	0,33	1,06	0,29	0,94	0,72	2,33
		Moyen	0,14	0,49	0,27	0,93	0,18	0,63	0,18	0,63	0,34	1,18	0,18	0,63	0,55	1,93
	Type sauvage	S. O.	0,22	0,84	0,11	0,41	0,32	1,22	0	0	0,42	1,63	0,15	0,57	0,6	2,31
	Ins_G719X	Insertions	Faible	0,15	0,48	0,08	0,26	0,14	0,46	0,05	0,15	0,1	0,32	0,31	0,99	0,4
Moyen			0,13	0,43	0	0	0,06	0,22	0,1	0,35	0	0	0,16	0,55	0,24	0,81
G719X		Faible	0,53	1,84	0,2	0,71	0,14	0,47	0,52	1,8	0,68	2,35	0,15	0,51	1,05	3,62
		Moyen	0,13	0,47	0,21	0,76	0,39	1,42	0	0	0,57	2,05	0,13	0,47	0,75	2,69
Type sauvage		S. O.	0,33	1,24	0,1	0,4	0,25	0,97	0	0	0,43	1,63	0,16	0,6	0,63	2,31
L858R_C797S		L858R	Faible	0,19	0,56	0	0	0,1	0,3	0,28	0,82	0,33	1	0,3	0,89	0,57
	Moyen		0,17	0,55	0	0	0,09	0,3	0,22	0,71	0,3	0,96	0,18	0,57	0,45	1,47
	C797S	Faible	0,12	0,39	0,32	1,01	0,26	0,82	0,14	0,46	0,11	0,36	0,28	0,89	0,54	1,72
		Moyen	0,09	0,3	0,28	0,98	0,2	0,7	0	0	0,24	0,83	0,12	0,41	0,45	1,55
	Type sauvage	S. O.	0		0,31	1,06	0,31	1,08	0,08	0,28	0,28	0,97	0,23	0,8	0,57	1,99
	Del_S768I	Délétions	Faible	0,66	1,99	0	0	0	0	0,18	0,54	0,84	2,52	0,28	0,84	1,12
Moyen			0,46	1,5	0	0	0	0	0	0	0,66	2,16	0,28	0,9	0,85	2,78
S768I		Faible	0,53	1,66	0,16	0,49	0,33	1,04	0,34	1,06	0,66	2,07	0,14	0,44	0,99	3,11
		Moyen	0,14	0,45	0,24	0,78	0,25	0,81	0,24	0,77	0,35	1,13	0,12	0,39	0,57	1,87
Type sauvage		S. O.	0,47	1,8	0,2	0,78	0,26	1,08	0	0	0,45	1,71	0,14	0,52	0,74	2,83

\* É.-T. : écart-type

\*\* % CV : coefficient de variation

Une analyse qualitative des résultats de la répétabilité des échantillons FFIP et de plasma a été effectuée, elle a démontré que le taux de détection des mutations d'EGFR ne dépend pas du lot de kits de dosage, de l'instrument Rotor-Gene Q ni de l'opérateur.

---

## Reproductibilité

La reproductibilité a été déterminée avec deux échantillons FFIP et de plasma, un positif et un négatif pour l'EGFR. Pour chaque dosage de l'EGFR, la répétabilité a été évaluée sur une mutation donnée de l'EGFR et testée sur 2 niveaux de mutation (moyen et faible). Chaque niveau a été testé en 5 réplicats sur au moins 75 cycles effectués (25 cycles par site) sur 5 jours minimum, avec au moins 70 mesures par niveau de mutation et par dosage (3 sites, un instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM par site, un opérateur par site, un lot de *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit utilisé). L'analyse quantitative des résultats de la reproductibilité est résumée dans le Tableau 11 pour les échantillons FFIP et dans le Tableau 12 pour les échantillons de plasma.

**Tableau 11. Résumé des résultats de la reproductibilité pour le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit avec des échantillons FFIP**

Mélange EGFR Plus	Cible EGFR Plus	Niveau de mutation testé	Au sein d'un cycle		Entre différents jours		Entre différents sites		Total	
			É.-T.*	CV**	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV
T790M_L861Q	T790M	Faible	0,23	2,7	0,48	5,48	0,12	1,38	0,54	6,26
		Moyen	0,19	3,42	0,44	7,95	0,13	2,29	0,5	8,95
	L861Q	Faible	0,22	4,85	0,7	15,48	0,31	6,81	0,79	17,59
		Moyen	0,21	8,7	0,66	27,6	0	0	0,69	28,93
	Type sauvage	S. O.	0,14	0,55	0,62	2,46	0,38	1,53	0,74	2,95
Ins_G719X	Insertions	Faible	0,28	5,29	0,21	4,02	0	0	0,35	6,64
		Moyen	0,15	7,11	0,15	6,87	0,09	3,99	0,23	10,66
	G719X	Faible	0,25	4	0,2	3,14	0,29	4,56	0,43	6,83
		Moyen	0,18	4,18	0,22	5,11	0,26	6,01	0,39	8,92
	Type sauvage	S. O.	0,14	0,54	0,14	0,54	0,15	0,61	0,25	0,97
L858R_C797S	L858R	Faible	0,27	3,4	0,15	1,92	0,33	4,11	0,45	5,67
		Moyen	0,22	4,23	0,15	2,92	0,31	5,96	0,42	7,87
	C797S	Faible	0,3	4,97	0,12	2,07	0,12	1,93	0,35	5,72
		Moyen	0,19	5,23	0,16	4,52	0,2	5,59	0,32	8,89
	Type sauvage	S. O.	0,12	0,46	0,21	0,82	0,05	0,18	0,24	0,96
Del_S768I	Délétions	Faible	0,24	4,16	0,24	4,16	0,19	3,33	0,37	6,53
		Moyen	0,15	4,43	0,11	3,12	0,16	4,65	0,25	7,14
	S768I	Faible	0,26	3,29	0,2	2,54	0,14	1,85	0,35	4,55
		Moyen	0,21	3,66	0,28	4,76	0,13	2,25	0,37	6,41
	Type sauvage	S. O.	0,12	0,49	0,11	0,45	0,26	1,02	0,31	1,22

\* É.-T. : écart-type

\*\* % CV : coefficient de variation



**Tableau 12. Résumé des résultats de la reproductibilité pour le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit avec des échantillons de plasma**

Mélange EGFR Plus	Cible EGFR Plus	Niveau de mutation testé	Au sein d'un cycle		Entre différents jours		Entre différents sites		Total	
			É.-T.*	% CV**	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV	É.-T.	% CV
T790M_L861Q	T790M	Faible	0,34	0,93	0,26	0,73	0,14	0,4	0,45	1,25
		Moyen	0,2	0,58	0,22	0,66	0,24	0,73	0,38	1,14
	L861Q	Faible	0,35	1,11	0,19	0,6	0,17	0,55	0,43	1,37
		Moyen	0,19	0,65	0,16	0,56	0,23	0,81	0,34	1,18
	Type sauvage	S. O.	0,18	0,67	0,86	3,28	0,47	1,8	1	3,8
	Ins_G719X	Insertions	Faible	0,29	0,93	0	0	0	0	0,3
Moyen			0,19	0,65	0	0	0	0	0,2	0,67
G719X		Faible	0,39	1,3	0,64	2,15	0,85	2,86	1,13	3,81
		Moyen	0,24	0,87	0,33	1,19	0,25	0,9	0,48	1,72
Type sauvage		S. O.	0,19	0,72	0,21	0,82	0,16	0,63	0,33	1,26
L858R_C797S		L858R	Faible	0,37	1,1	0,35	1,04	0,47	1,38	0,69
	Moyen		0,17	0,55	0,35	1,12	0,48	1,54	0,62	1,98
	C797S	Faible	0,29	0,94	0,23	0,74	0,31	0,98	0,48	1,54
		Moyen	0,2	0,68	0,18	0,63	0,35	1,22	0,44	1,53
	Type sauvage	S. O.	0,3	1,04	0,38	1,31	0,34	1,18	0,59	2,05
	Del_S768I	Délétions	Faible	0,3	0,91	0,38	1,16	0,54	1,62	0,73
Moyen			0,21	0,69	0,32	1,04	0,52	1,7	0,65	2,11
S768I		Faible	0,17	0,53	0,27	0,84	0,39	1,21	0,5	1,57
		Moyen	0,2	0,66	0,17	0,56	0,28	0,92	0,39	1,26
Type sauvage		S. O.	0,17	0,65	0,19	0,71	0,3	1,13	0,39	1,49

\* É.-T. : écart-type

\*\* % CV : coefficient de variation

Une analyse qualitative des résultats de la reproductibilité des échantillons FFIP et de plasma a été effectuée, elle a démontré que le taux de détection des mutations d'EGFR ne dépend pas du site.

---

## Substances interférentes

Au total, 36 substances potentiellement interférentes ont été testées sur trois échantillons FFIP et de plasma, 2 positifs et un négatif pour l'EGFR (Tableau 13). Les substances potentiellement interférentes endogènes et exogènes pouvant se trouver dans un échantillon avant la préparation de l'ADN ont été mélangées avec les échantillons à un taux maximal cliniquement pertinent. Les substances potentiellement interférentes exogènes issues de la préparation de l'ADN ont été mélangées avec l'ADN extrait à un taux calculé dans le pire cas possible. Chaque échantillon (contrôle et mélangé avec une substance potentiellement interférente) a été testé en 6 réplicats, pour un total de 51 cycles (1 lot de *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit utilisé). L'analyse quantitative n'a révélé aucune interférence des substances testées.

**Tableau 13. Substances potentiellement interférentes testées sur des échantillons FFIP**

<b>Substances testées</b>	<b>Concentration testée</b>
Formol 4–10 %	4,10 E-05 %
Cire de paraffine	4,10 E-05 %
Deparaffinization Solution	4,10 E-05 %
ATL (QIAamp FFPE Lysis Buffer)	1,30 E-05 %
Protéinase K	4,00 E-05 %
RNase A	1,99 E-07 %
Tampon AL (QIAamp FFPE Lysis Buffer)	1,99 E-03 %
Éthanol 96–100 %	1,99 E-03 %
AW1 (QIAamp FFPE Wash Buffer)	1,00 E-01 %
AW2 (QIAamp FFPE Wash Buffer)	1,00 E+00 %
QSB1 (QIASymphony FFPE Buffer)	4,19 E-07 %
MBS (QIASymphony FFPE Magnetic Beads Solution)	6,15 E-09 %
QSW1 (QIASymphony FFPE Wash Buffer)	8,80 E-04 %
QSW2 (QIASymphony FFPE Wash Buffer)	8,80E-02 %
AVE (QIASymphony FFPE Elution Buffer)	5,00 E+00 %
ATE (QIAamp FFPE Tissue Elution Buffer)	5,00 E+00 %

**Tableau 14. Substances potentiellement interférentes testées sur des échantillons de plasma**

<b>Substances testées</b>	<b>Concentration testée</b>
Buffer ACL (QIAamp Plasma Lysis Buffer)	5,77 E-05 %
Buffer ACB (QIAMP Plasma Buffer)	2,92 E-04 %
Buffer ACW1 (QIAamp Plasma Wash Buffer)	1,00 E-03 %
Buffer ACW2 (QIAamp Plasma Wash Buffer)	1,25 E-02 %
Éthanol 96–100 %	1,25 E-01 %
Buffer AVE (QIAamp Plasma Elution Buffer)	5,00 E+00 %
MBS3 (QIASymphony Plasma Magnetic Beads Solution)	3,48 E-05 %
Protéinase K	7,49 E-05 %
QSB4 (QIASymphony Plasma Buffer)	5,57 E-04 %
QSW8 (QIASymphony Plasma Wash Buffer)	1,11 E-01 %
QSW9 (QIASymphony Plasma Wash Buffer)	4,62 E-01 %
QSW10 (QIASymphony Plasma Wash Buffer)	5,00 E+00 %
QSE1/QSE2 (QIASymphony Plasma Elution Buffer)	5,00 E+00 %
Acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA)	3,39 E+00 µmol/l
Bilirubine non conjuguée	684 µmol/l
Bilirubine conjuguée	475 µmol/l
Hémoglobine	10 g/l
Triglycérides	16,94 mmol/l
Xylène	684 µmol/l
Chloroforme	5,00 E+00 %

---

## Spécificité et réactivité croisée

La spécificité et la réactivité croisée du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit ont été évaluées en testant la capacité du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit à détecter et identifier correctement (s'il y a lieu) les mutations de l'EGFR présentées dans le Tableau 1. Pour les échantillons FFIP, l'étude a été menée sur l'ensemble des mutations ciblées de l'EGFR. La spécificité pour les échantillons de plasma a été évaluée sur les mutations ciblées C797Sa et C797Sb. Tous les échantillons ont été testés une fois par lot de *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, 3 lots de *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit ont été utilisés. L'étude a révélé que toutes les mutations ciblées ont été détectées par le dosage d'EGFR prévu et aucun signal n'a été observé avec d'autres dosages.

La détection par le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit de la mutation rare L858Q non ciblée a également été évaluée en testant des échantillons FFIP et de plasma. Cette étude a révélé que la mutation L858Q n'était pas détectée par le dosage de C797S mais pouvait être détectée par le dosage de L858R à un pourcentage de mutation élevé (FFIP) et avec un nombre de copies élevé (plasma).

## Contamination croisée et transfert

La contamination croisée des 4 procédures EGFR Plus, c.-à-d. avec les 4 méthodes de préparation de l'ADN, a été évaluée dans différentes conditions alternant les échantillons positifs et négatifs pour l'EGFR. Au moins 3 cycles de chaque procédure EGFR Plus ont été effectués (1 lot de *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit a été utilisé par procédure) et aucune des 4 procédures n'a présenté de contamination croisée.

Au cours de l'évaluation de la contamination croisée, le transfert des quatre procédures EGFR Plus a été évalué et n'a révélé aucun transfert entre les cycles.

---

## Durée d'utilisation

La durée maximale entre la préparation de la plaque de qPCR et le lancement du cycle de qPCR a été déterminée pour chaque dosage d'EGFR sur une mutation d'EGFR donnée, et testée sur un taux faible de mutation (un instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, 1 opérateur, 1 lot de *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit utilisé). Les 8 échantillons positifs FFIP ont été testés immédiatement après la préparation de la plaque de qPCR et après 3 heures, 6 heures et 24 heures de conservation à +2 °C/+8 °C. La durée d'utilisation maximale acceptable est de 24 heures, mais il est recommandé de lancer le cycle de qPCR du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit dès que possible après la préparation de la plaque (autrement dit après le chargement de tous les échantillons à tester).

# Performances cliniques

Précision : comparaison avec la méthode d'analyse de référence

L'étude a montré un haut niveau de concordance entre le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit et la ou les méthode(s) d'analyse de référence (Méthodes de référence et de résolution des divergences utilisées : qPCR d'APN – Karachaliou et al., 2015 et Mayo-de-las-Casas et al., 2017 ; séquençage bidirectionnel Sanger ; séquençage à haut débit, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit V2, CE (N° de réf. 874111) et *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit, CE (N° de réf. 870311)).

Les résultats ont été analysés afin d'évaluer le pourcentage de concordance positive (Positive Percent Agreement, PPA), le pourcentage de concordance négative (Negative Percent Agreement, NPA) et le pourcentage de concordance globale (Overall Percent Agreement, OPA) par rapport au statut mutationnel de l'EGFR (MT ou WT) et à la cible d'EGFR (identification des mutations) pour les échantillons FFIP et de plasma entre le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit et la méthode de référence correspondante et après la méthode de résolution des divergences.

Dans l'étude, 170 échantillons FFIP ont été testés et 148 ont donné des résultats valides pouvant être interprétés (148 statuts d'échantillon et 155 statuts de cible).

Lorsque les résultats du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit ont été comparés à ceux de la méthode de référence correspondante, 4 statuts d'échantillon d'EGFR (MT ou WT) ont révélé une discordance. Après l'analyse de la méthode de résolution des divergences, le nombre de statuts d'échantillon discordants (MT ou WT) est revenu à un faux négatif. Les PPA, NPA et OPA avec les intervalles de confiance (IC) bilatéraux correspondants de 95 % sont résumés dans le Tableau 15 et le Tableau 16.

**Tableau 15. Analyse de la concordance du statut mutationnel global par échantillon – Comparaison du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit et de la méthode de référence pour les échantillons FFIP**

		Limite inférieure intervalle de confiance 95 %	Limite supérieure intervalle de confiance 95 %
<b>Pourcentage de concordance globale</b>	97,30 %	93,22 %	99,26 %
<b>Pourcentage de concordance positive (sensibilité)</b>	93,65 %	84,53 %	98,24 %
<b>Pourcentage de concordance négative (spécificité)</b>	100,00 %	95,75 %	100,00 %

**Tableau 16. Analyse de la concordance du statut mutationnel global par échantillon après recherche des discordances pour les échantillons FFIP**

		Limite inférieure intervalle de confiance 95 %	Limite supérieure intervalle de confiance 95 %
<b>Pourcentage de concordance globale</b>	99,32 %	96,29 %	99,98 %
<b>Pourcentage de concordance positive (sensibilité)</b>	98,33 %	91,06 %	99,96 %
<b>Pourcentage de concordance négative (spécificité)</b>	100,00 %	95,89 %	100,00 %

Lorsque les résultats du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit ont été comparés à ceux de la méthode de référence correspondante, 9 statuts de cible d'EGFR ont révélé une discordance (Tableau 17). Après l'analyse de la méthode de résolution des divergences, le nombre de statuts de cible discordants est revenu à 3, 2 faux négatifs et 1 faux positif (Tableau 18). Les PPA, NPA et OPA avec les intervalles de confiance (IC) bilatéraux correspondants de 95 % sont résumés dans le Tableau 19 et le Tableau 20.



**Tableau 17. Statut mutationnel FFIP détaillé par cible – Comparaison du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit et de la méthode de référence**

	Méthode de référence	WT	T790M	L861Q	Insertions	G719X	L858R	C797S	Délétions	Ex21 MT	Total
		<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit									
WT		85	1	-	-	2	-	-	2	1	91
T790M		2	2	-	-	-	-	-	-	-	4
L861Q		-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Insertions		1	-	-	1	-	-	-	-	-	2
G719X		-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
L858R		-	-	-	-	-	19	-	-	-	19
C797S		-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Délétions		-	-	-	-	-	-	-	36	-	36
Ex21 MT		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>		<b>88</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>19</b>	<b>1</b>	<b>38</b>	<b>1</b>	<b>155</b>

**Tableau 18. Statut mutationnel FFIP détaillé par cible après recherche des discordances**

Méthode de référence et de résolution des divergences	WT	T790M	L861Q	Insertions	G719X	L858R	C797S	Délétions	Ex21 MT	Total
<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit										
WT	89	-	-	-	2	-	-	-	-	91
T790M	-	4	-	-	-	-	-	-	-	4
L861Q	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Insertions	1	-	-	1	-	-	-	-	-	2
G719X	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
L858R	-	-	-	-	-	19	-	-	-	19
C797S	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Délétions	-	-	-	-	-	-	-	36	-	36
Ex21 MT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	90	4	1	1	3	19	1	36	-	155

**Tableau 19. Analyse de la concordance du statut mutationnel global par cible – Comparaison du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit et de la méthode de référence pour les échantillons FFIP**

		Limite inférieure intervalle de confiance 95 %	Limite supérieure intervalle de confiance 95 %
Pourcentage de concordance globale	94,19 %	89,26 %	97,31 %
Pourcentage de concordance positive (sensibilité)	91,04 %	81,52 %	96,64 %
Pourcentage de concordance négative (spécificité)	96,59 %	90,36 %	99,29 %

**Tableau 20. Analyse de la concordance du statut mutationnel global par cible après recherche des discordances pour les échantillons FFIP**

		<b>Limite inférieure intervalle de confiance 95 %</b>	<b>Limite supérieure intervalle de confiance 95 %</b>
<b>Pourcentage de concordance globale</b>	98,06 %	94,44 %	99,60 %
<b>Pourcentage de concordance positive (sensibilité)</b>	96,92 %	89,32 %	99,62 %
<b>Pourcentage de concordance négative (spécificité)</b>	98,89 %	93,96 %	99,97 %

Dans l'étude, 106 échantillons de plasma ont été testés et 106 ont donné des résultats valides pouvant être interprétés (106 statuts d'échantillon et 121 statuts de cible).

Lorsque les résultats du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit ont été comparés à ceux de la méthode de référence correspondante, 9 statuts d'échantillon d'EGFR (MT ou WT) ont révélé une discordance. Après l'analyse de la méthode de résolution des divergences, le nombre de statuts d'échantillon discordants (MT ou WT) est revenu à 3, 1 faux négatif et 2 faux positifs. Les PPA, NPA et OPA avec les intervalles de confiance (IC) bilatéraux correspondants de 95 % sont résumés dans le Tableau 21 et le Tableau 22.

**Tableau 21. Analyse de la concordance du statut mutationnel global par échantillon – Comparaison du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit et de la méthode de référence pour les échantillons de plasma**

		Limite inférieure intervalle de confiance 95 %	Limite supérieure intervalle de confiance 95 %
<b>Pourcentage de concordance globale</b>	91,51 %	84,49 %	96,04 %
<b>Pourcentage de concordance positive (sensibilité)</b>	87,27 %	75,52 %	94,73 %
<b>Pourcentage de concordance négative (spécificité)</b>	96,08 %	86,54 %	99,52 %

**Tableau 22. Analyse de la concordance du statut mutationnel global par échantillon après recherche des discordances pour les échantillons de plasma**

		Limite inférieure intervalle de confiance 95 %	Limite supérieure intervalle de confiance 95 %
<b>Pourcentage de concordance globale</b>	97,17 %	91,95 %	99,41 %
<b>Pourcentage de concordance positive (sensibilité)</b>	97,96 %	89,15 %	99,95 %
<b>Pourcentage de concordance négative (spécificité)</b>	96,49 %	89,89 %	99,57 %

Lorsque les résultats du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit ont été comparés à ceux de la méthode de référence correspondante, 18 statuts de cible d'EGFR ont révélé une discordance (Tableau 23). Après l'analyse de la méthode de résolution des divergences, le nombre de statuts de cible discordants est revenu à 5, 3 faux positifs et 2 faux négatifs (Tableau 24). Les PPA, NPA et OPA avec les intervalles de confiance (IC) bilatéraux correspondants de 95 % sont résumés dans le Tableau 25 et le Tableau 26.

**Tableau 23. Statut mutationnel dans le plasma détaillé par cible – Comparaison du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit et de la méthode de référence**

Méthode de référence	WT	T790M	L861Q	Insertions	L858R	C797S	Délétions	Total
	<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit							
WT	49	6			6		1	62
T790M		8						8
L861Q			2					2
Insertions				1				1
L858R					13			13
C797S								0
Délétions	4					1	30	35
Total	53	14	2	1	19	1	31	121

**Tableau 24. Statut mutationnel dans le plasma détaillé par cible après recherche des discordances**

Méthode de référence et de résolution des divergences	WT	T790M	L861Q	Insertions	L858R	C797S	Délétions	Total
	<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit							
WT	60	1			1			62
T790M		8						8
L861Q			2					2
Insertions				1				1
L858R					13			13
C797S								0
Délétions	3						32	35
Total	63	9	2	1	14	0	32	121

**Tableau 25. Analyse de la concordance du statut mutationnel global par cible – Comparaison du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit et de la méthode de référence pour les échantillons de plasma**

		Limite inférieure intervalle de confiance 95 %	Limite supérieure intervalle de confiance 95 %
<b>Pourcentage de concordance globale</b>	85,12 %	77,51 %	90,94 %
<b>Pourcentage de concordance positive (sensibilité)</b>	80,60 %	69,11 %	89,24 %
<b>Pourcentage de concordance négative (spécificité)</b>	90,74 %	79,70 %	96,92 %

**Tableau 26. Analyse de la concordance du statut mutationnel global par cible après recherche des discordances pour les échantillons de plasma**

		Limite inférieure intervalle de confiance 95 %	Limite supérieure intervalle de confiance 95 %
<b>Pourcentage de concordance globale</b>	95,87 %	90,62 %	98,64 %
<b>Pourcentage de concordance positive (sensibilité)</b>	96,55 %	88,09 %	99,58 %
<b>Pourcentage de concordance négative (spécificité)</b>	95,24 %	86,71 %	99,01 %

---

## Références

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

- 
8. Porta, R. et al. (2008) Erlotinib customization based on epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in stage IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p). J. Clin. Oncol. 26 (May 20 suppl), abstr 8038.
  9. Lynch, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med. 2004 May 20;350(21):2129-39. Epub 2004 Apr 29.
  10. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) Nucleic Acids Res. 17, 2503.
  11. Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T., Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nature Biotech. 17, 804.



# Guide de dépannage

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

## Commentaires et suggestions

---

### Cycle non valide en raison d'un contrôle positif non valide

- |   |  |
|---|--|
| a) Un composant du mélange réactionnel n'a pas été ajouté                               | Vérifiez que le mélange réactionnel a été correctement préparé.<br>Vérifiez que tous les composants du mélange réactionnel pour qPCR ont été ajoutés.<br>Répétez le cycle de qPCR  |
| b) Mélange réactionnel dégradé  | Le kit a été congelé/décongelé trop souvent, les composants du kit n'ont pas été conservés entre $-30$ et $-15$ °C ou les mélanges d'amorces et sondes n'ont pas été conservés à l'abri de la lumière.<br>Vérifiez les conditions de conservation et la date de péremption (voir l'étiquette) des réactifs et utilisez un nouveau kit.<br>Répétez le cycle de qPCR |
| c) Volume pipeté trop faible : il est possible que le volume de pipetage soit incorrect | Vérifiez le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Vérifiez que les 5 $\mu$ l de contrôle ont bien été ajoutés.<br>Vérifiez et réétalonnez les pipettes avant de répéter le cycle de qPCR.   |

## Commentaires et suggestions

---

- |  |   |
|--|---|
| d) Dysfonctionnement de l'instrument Rotor-Gene Q MDx  | Vérifiez les journaux de maintenance de l'instrument.<br>Répétez le cycle de qPCR   |
| e) Erreur au niveau des accessoires de l'instrument Rotor-Gene Q MDx   | Le 72-Well Rotor n'est peut-être pas correctement verrouillé.<br>Répétez le cycle de qPCR   |
| f) Inversion des tubes en barrettes et/ou des ID d'échantillon   | Vérifiez le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.<br>Répétez le cycle de qPCR  |
| g) Contrôles manquants ou chargés sur une position incorrecte  | Assurez-vous que le contrôle correct est chargé sur la bonne position.<br>Répétez le cycle de qPCR  |
| h) Mélange insuffisant des échantillons de contrôle  | La décongélation des contrôles n'était pas terminée avant le chargement ou le mélange des contrôles avec le mélange réactionnel (en homogénéisant) n'a pas été correctement effectué.<br>Répétez le cycle de qPCR |
| i) Fermeture incomplète du tube  | Le tube n'a pas été complètement rebouché, ce qui a entraîné une évaporation lors du cycle de qPCR.<br>Répétez le cycle de qPCR   |
| j) Les conditions de conservation d'un ou plusieurs composants du kit n'ont pas respecté les consignes fournies dans la section « Conditions de conservation » (page 26) | Vérifiez les conditions de conservation et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utilisez un nouveau kit si nécessaire.   |

## Commentaires et suggestions

---

- k) Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit a expiré  
Vérifiez les conditions de conservation et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utilisez un nouveau kit si nécessaire.
- l) Courbe d'amplification incorrecte (artefact)  
Vérifiez la courbe correspondante pour voir s'il y a des courbes anormales (c.-à-d. une ligne droite).  
Répétez le cycle de qPCR

### Cycle non valide en raison d'une amplification du contrôle sans matrice

- a) Contamination croisée ou contamination des réactifs  
Manipulez toujours les échantillons, les composants du kit et les consommables en accord avec les pratiques recommandées pour empêcher les contaminations par transfert.  
Assurez-vous que les pointes sont changées lorsque des réactifs différents sont pipetés ou lorsque des tubes différents sont chargés. Préparez le mélange réactionnel pour qPCR avec le matériel dédié (pipettes, pointes, etc.).  
Préparez le mélange réactionnel pour qPCR et la réaction NTC dans une zone spéciale où aucune matrice d'ADN (ADN, plasmides ou produits de PCR) n'est introduite.  
Si vous identifiez une contamination croisée, remplacez tous les réactifs.  
Répétez le cycle de qPCR
- b) Courbe d'amplification incorrecte (artefact)  
Vérifiez la courbe correspondante pour voir s'il y a des courbes anormales (c.-à-d. une ligne droite).  
Répétez le cycle de qPCR
- c) Inversion du tube en barrette et/ou de l'identifiant de l'échantillon  
Vérifiez le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.  
Répétez le cycle de qPCR

## Commentaires et suggestions

---

- d) Dysfonctionnement de l'instrument Rotor-Gene Q MDx
- Vérifiez les journaux de maintenance de l'instrument.
- Par exemple, un mauvais alignement de la lentille peut entraîner un bruit de fond plus élevé ou un artefact. Si l'alignement de la lentille n'est pas inclus dans votre plan de maintenance, merci de contacter les services techniques QIAGEN pour plus d'informations et une éventuelle intervention.

### Échantillon non valide en raison d'une amplification nulle ou faible dans le contrôle interne

- a) Concentration d'ADN trop faible dans l'échantillon
- Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit est optimisé pour une concentration de travail de 5 ng/µl (ADN d'échantillons FFIP) et 5 µl d'extrait pur d'ADNlc d'échantillons de plasma.
- Vérifiez la concentration (pour les échantillons FFIP).
- Répétez l'étape de qPCR pour l'échantillon.
- b) Qualité médiocre de l'échantillon d'ADN
- Vérifiez la concentration (pour les échantillons FFIP).
- Répétez l'étape de qPCR avec un autre échantillon (dans l'idéal, fraîchement coupé).
- Répétez le cycle avec une concentration d'échantillon supérieure.
- Remarque** : en testant une concentration supérieure d'ADNg, vous pouvez obtenir une valeur de  $C_T$  de l'exon 2 plus précoce mais cela accroît le risque d'inhibition. La valeur de  $C_T$  de l'exon 2 peut donc être plus tardive avec une concentration inférieure.

## Commentaires et suggestions

---

- c) Présence d'un inhibiteur dans l'échantillon
- Diluez l'échantillon puis répétez le cycle avec une concentration d'échantillon inférieure.
- Remarque** : en testant une concentration inférieure, vous pouvez obtenir un signal de l'exon 2 plus précoce s'il y a des inhibiteurs dans l'échantillon à 5 ng/µl.
- Extrayez de nouveau l'échantillon (FFIP) avec davantage de coupes puis répétez le cycle.
- Remarque** : en éluant davantage de coupes dans le même volume, la concentration d'inhibiteur peut s'en trouver accrue si l'échantillon est normalisé à 5 ng/µl.
- d) Volume pipeté trop faible : il est possible que le volume de pipetage soit incorrect
- Vérifiez le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Vérifiez que les 5 µl d'échantillon ont bien été ajoutés.
- Vérifiez et réétalonnez les pipettes avant de répéter le cycle de qPCR.
- e) Fermeture incomplète du tube
- Le tube n'a pas été complètement rebouché, ce qui a entraîné une évaporation lors du cycle de qPCR.
- Répétez l'étape de qPCR pour l'échantillon.
- f) Les conditions de conservation d'un ou plusieurs composants du kit n'ont pas respecté les consignes fournies dans la section « Conditions de conservation » (page 26)
- Vérifiez les conditions de conservation et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utilisez un nouveau kit si nécessaire.
- g) Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit a expiré
- Vérifiez les conditions de conservation et la date de péremption (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utilisez un nouveau kit si nécessaire.

## Commentaires et suggestions

---

- h) Fluorescence anormale
- N'écrivez pas sur les tubes. Manipulez les tubes avec précaution. Portez des gants.
- Vérifiez à l'œil nu si le tube de réaction de PCR contient des particules magnétiques noires (issues de l'extraction automatisée avec le QIASymphony). Vous pouvez éliminer ces particules comme indiqué dans les manuels des kits d'extraction correspondants.

### Échantillon non valide en raison d'une amplification précoce du contrôle interne dans les échantillons

- a) Concentration d'ADN trop élevée dans l'échantillon
- Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit est optimisé pour une concentration de travail (FFIP) de 5 ng/μl.
- Pour l'ADNg d'échantillons FFIP : vérifiez la concentration d'ADN. Si l'ADN n'est pas à cette concentration, diluez-le.
- Pour l'ADNlc d'échantillons de plasma : diluez l'échantillon.
- Répétez l'étape de qPCR pour l'échantillon.
- b) Volume pipeté trop important : il est possible que le volume de pipetage soit incorrect
- Vérifiez le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. Vérifiez que les 5 μl d'échantillon ont bien été ajoutés.
- Vérifiez et réétalonnez les pipettes avant de répéter le cycle de qPCR pour l'échantillon.
- c) Il est possible que la courbe d'amplification soit incorrecte
- Vérifiez la courbe correspondante pour voir si elle présente des faux positifs (c.-à-d. une ligne droite plutôt qu'une amplification exponentielle).
- Répétez l'étape de qPCR pour l'échantillon.
- d) Fluorescence anormale
- N'écrivez pas sur les tubes. Manipulez les tubes avec précaution. Portez des gants.
- Vérifiez à l'œil nu si le tube de réaction de PCR contient des particules magnétiques noires (issues de l'extraction automatisée avec le QIASymphony). Vous pouvez éliminer ces particules comme indiqué dans les manuels des kits d'extraction correspondants.

## Commentaires et suggestions

---

- e) Dysfonctionnement de l'instrument Rotor-Gene Q MDx
- Vérifiez les journaux de maintenance de l'instrument.
- Par exemple, un mauvais alignement de la lentille peut entraîner un bruit de fond plus élevé. Si l'alignement de la lentille n'est pas inclus dans votre plan de maintenance, merci de contacter les services techniques QIAGEN pour plus d'informations et une éventuelle intervention.

### Échantillon non valide en raison d'une valeur de $\Delta$ CT ou CT précoce imprévue

- a) Échantillon non valide – Valeur de CT trop faible ou inférieure à la plage de seuil
- Configurez un nouveau cycle de PCR pour répéter l'échantillon en portant une attention particulière aux étapes de mélange.













## Contrôle qualité

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



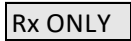

Le contrôle qualité de la totalité du kit a été effectué sur un instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Ce kit a été fabriqué conformément à la norme ISO 13485. Les certificats d'analyse sont disponibles sur demande à l'adresse [www.qiagen.com/support](http://www.qiagen.com/support).

# Symboles

Les symboles suivants peuvent figurer dans le mode d'emploi ou sur l'emballage et les étiquettes :

Symbole	Définition du symbole
 $\Sigma$ <N>	Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions
	À utiliser avant
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Numéro de matériel (c.-à-d. étiquette de composant)
	Composants
	Contient
	Nombre
	Code article international (Global Trade Item Number, GTIN)
<b>R<sub>n</sub></b>	R désigne une révision du mode d'emploi et n représente le numéro de révision
	Limites de température
	Fabricant



Symbole	Définition du symbole
	Consulter le mode d'emploi
	Conserver à l'abri des rayons du soleil
	Sur prescription uniquement
	Avertissement/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](http://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](http://www.qiagen.com)).

# Annexe A : installation du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 et du plug-in Gamma, et importation du profil du dosage

## Points importants avant de commencer


- Le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 doit être installé sur l'ordinateur connecté à l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM. Pour télécharger le logiciel, allez sur la page produit de Rotor-Gene AssayManager v2.1 sur [www.qiagen.com/9025620](http://www.qiagen.com/9025620) > **Resources (Ressources)** > **Operating Software (Logiciel d'exploitation)**. Pour plus de détails sur l'installation du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application, consultez le *Manuel d'utilisation de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.
- Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit nécessite un plug-in spécifique : le plug-in Gamma. Pour obtenir la toute dernière version de ce plug-in, allez sur la page produit de Rotor-Gene AssayManager v2.1 sur [www.qiagen.com/9025620](http://www.qiagen.com/9025620) > **Resources (Ressources)** > **Operating Software (Logiciel d'exploitation)**. Ce plug-in doit être installé sur un ordinateur sur lequel est déjà installé le logiciel Rotor-Gene AssayManager, au minimum version 2.1.
- Le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit requiert également un profil du dosage. Ce profil du dosage contient tous les paramètres nécessaires à l'exécution des cycles de PCR et à l'analyse automatisée des données. Deux profils du dosage peuvent être utilisés avec le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit :
  - Un dédié au test des échantillons d'ADNg à partir de FFIP :  
**therascreen\_EGFR\_Plus\_FFPE**
  - Un dédié au test des échantillons d'ADNlc à partir de plasma :  
**therascreen\_EGFR\_Plus\_Plasma**

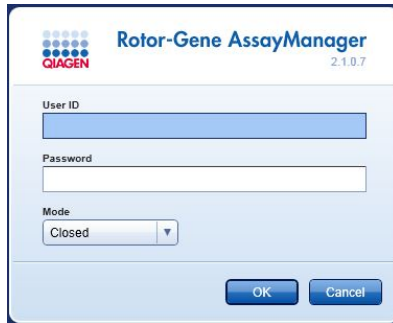
- Les profils du dosage correspondent aux fichiers « .iap » qui peuvent être téléchargés à partir de la page produit du *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit sur [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Les profils du dosage doivent être importés dans le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1.

## Procédure

Pour plus de détails sur l'installation du plug-in Gamma et sur l'importation des profils du dosage dans le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1, procédez comme suit.

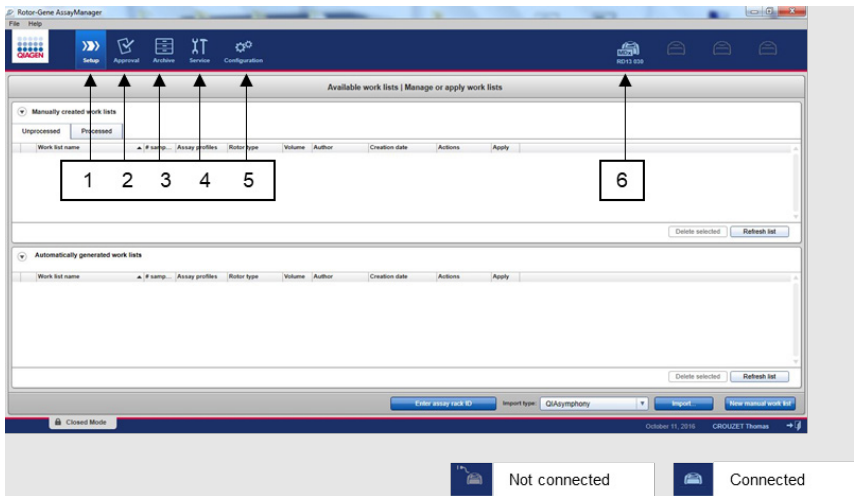
L'installation et l'importation du plug-in Gamma et du profil du dosage sont détaillées dans le *Manuel d'utilisation de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* et dans le *Manuel d'utilisation du plug-in Gamma*.

1. Téléchargez le plug-in Gamma sur le site de QIAGEN.
2. Pour l'installer, double-cliquez sur le fichier **RGAM\_V2\_1\_Gamma\_Plug-in.Installation.V1\_0\_x.msi** ( $x \geq 0$ ) puis suivez les consignes d'installation. Pour obtenir une description détaillée de ce processus, consultez la section « Installation des plug-ins » dans le *Manuel d'utilisation de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.
3. Une fois l'installation du plug-in effectuée avec succès, une personne disposant des droits d'administrateur pour le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 doit importer le profil du dosage le plus récent comme suit.
  - 3a. Allez dans Windows Explorer et enregistrez le profil du dosage dans le dossier suivant :  
C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Import\AssayProfiles.
  - 3b. Cliquez sur l'icône de Rotor-Gene Assay Manager v2.1.  La fenêtre de connexion apparaît.



**Figure 21. Rotor-Gene AssayManager v2.1.**

- 3c. Saisissez vos ID utilisateur et mot de passe. Laissez l'option Mode sur Closed (Fermé). Cliquez sur OK.  
L'écran du logiciel Rotor-Gene AssayManager s'ouvre.



**Figure 22. Rotor-Gene AssayManager v2.1.** 1 = Onglet Setup (Paramétrage). Cet onglet permet de gérer ou d'appliquer des listes de tâches 2= Onglet Approval (Approbation). Cet onglet permet de trouver les expériences précédentes. 3 = Onglet Archive. Cet onglet permet de trouver les expériences précédentes approuvées. 4 = Onglet Service. Sous cet onglet, vous trouvez une piste d'audit pour chaque fichier généré par le logiciel. 5 = Onglet Configuration. Cet onglet permet de configurer tous les paramètres du logiciel. 6 = Icône de l'instrument Rotor-Gene Q (RGQ), qui indique à l'utilisateur si un cycleur spécifique est connecté. Il est possible de connecter jusqu'à quatre instruments RGQ à un même ordinateur.

- 3d. Pour garantir la sécurité des processus de l'ensemble du système, définissez les paramètres de configuration suivants pour le mode fermé :
- Sélectionnez l'onglet Settings (Paramètres) dans l'environnement Configuration.
  - Dans le panneau Work list (Liste de tâches) sous Closed mode (Mode fermé), cochez les cases **Material number required** (Numéro de matériel requis), **Valid expiry date** (Date de péremption valide) et **Lot number required** (Numéro de lot requis).

**Remarque** : ces paramètres de configuration ne peuvent être définis que par les utilisateurs ayant des droits d'administrateur.


- 3e. Dans l'environnement Configuration, sélectionnez l'onglet Assay Profiles (Profils du dosage).
- 3f. Cliquez sur **Import** (Importer).
- 3g. Dans la boîte de dialogue Open file (Ouvrir un fichier), sélectionnez **therascreen\_EGFR\_Plus\_FFPE\_V1\_0\_0.iap** comme premier profil du dosage d'EGFR.
- 3h. Cliquez sur Open (Ouvrir).  
Le profil du dosage est alors chargé et ajouté à la liste des profils du dosage utilisables dans l'environnement Setup (Paramétrage)
- 3i. Répétez les étapes 3e à 3h pour charger et ajouter **therascreen\_EGFR\_Plus\_Plasma\_V1\_0\_0.iap** comme deuxième profil du dosage.
- Remarque** : il n'est pas possible d'importer deux fois la même version d'un profil du dosage.

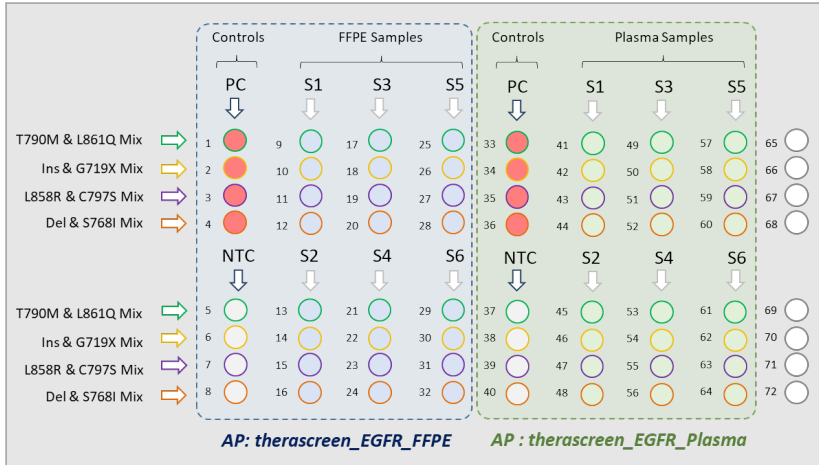
## Annexe B : exécution des profils du dosage FFIP et plasma dans la même expérience

Deux profils du dosage peuvent être utilisés avec le *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit :

- Pour tester les échantillons d'ADNg à partir de FFIP : **therascreen\_EGFR\_Plus\_FFPE**
- Pour tester les échantillons d'ADNlc à partir de plasma : **therascreen\_EGFR\_Plus\_Plasma**.

Pour exécuter les profils du dosage FFIP et plasma dans la même expérience :

1. Configurez l'expérience de qPCR comme indiqué sous « Configuration de la qPCR » et « Protocole : préparation de l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM » dans la section « Protocole : évaluation des mutations de l'*EGFR* par qPCR sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM » (à partir de la page 43).
  -  Il vous faut une disposition de plaques spécifique (Figure 23) pour exécuter les deux profils du dosage dans la même expérience :
  - Les contrôles (contrôle positif, NTC) doivent être ajoutés deux fois et positionnés dans les puits qui précèdent les échantillons pour chaque type d'échantillon (FFIP et plasma), comme indiqué sur la Figure 23.
  - Tous les échantillons de même type (FFIP ou plasma) doivent être testés dans des puits qui se suivent. L'ordre dans lequel les deux types d'échantillon sont testés (FFIP ou plasma en premier) n'a pas d'importance.
  - Il ne doit y avoir aucun puits vide entre le dernier puits contenant un échantillon du premier type (p. ex. sur la Figure 23, le puits 32 contenant l'échantillon S6 FFIP) et le premier puits contenant le contrôle positif associé au test du deuxième type d'échantillon (p. ex. sur la Figure 23, le contrôle positif dans le puits 33 associé au profil du dosage plasma).

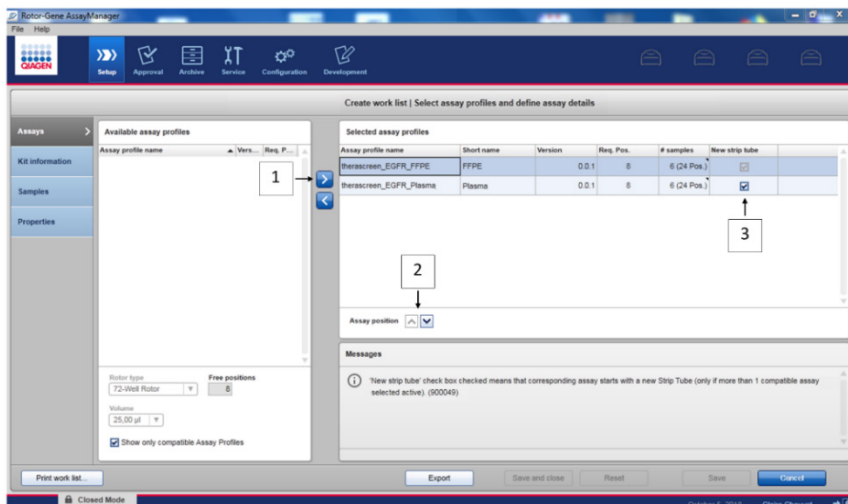


**Figure 23. Dispositif de plaques pour tester des échantillons FFIP et plasma dans la même expérience de qPCR.** PC : contrôle positif EGFRv3 ; NTC : contrôle sans matrice (eau) ; AP : profil du dosage ; mélanges réactionnels : mélange T790M & L861Q EGFRv3, mélange insertions & G719X EGFRv3, mélange L858R & C797S EGFRv3, mélange délétions & S768I EGFRv3. Échantillon 1 (S1) à échantillon 6 (S6) : échantillons d'ADN. ○ = puits vides.

2. Passez aux étapes 13 à 17 de la procédure « Créer une liste de tâches et commencer un cycle de qPCR » (à partir de la page 48).
3. Importez les deux profils du dosage à la suite comme indiqué dans les étapes 18 et 19 de la procédure « Créer une liste de tâches et commencer un cycle de qPCR » (page 48). Veillez à importer les profils du dosage dans le bon ordre indiqué par la disposition de plaques : par exemple si vous utilisez la disposition de la Figure 23, importez en premier le profil du dosage FFIP puis le profil du dosage plasma.

**Remarque :** vous pouvez si nécessaire changer la position des profils du dosage afin que ces derniers soient lus dans le bon ordre (Figure 24).

4. Cochez la case **New strip tube** (Nouveau tube en barrettes) pour indiquer que le dosage correspondant commence avec un nouveau tube en barrettes (Figure 24).



**Figure 24. Positions des dosages.** 1 = sélectionnez et transférez les deux profils du dosage vers la liste de tâches. 2 = la position des dosages peut être modifiée : déplacez le profil du dosage vers le haut ou le bas à l'aide des flèches. 3 = cochez la case « New strip tube » (Nouveau tube en barrettes).

5. Continuez la procédure à partir de l'étape 20, page 48.



# Informations de commande

Produit	Table des matières	N° de réf.
<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit (24)	Pour 24 réactions : mélange T790M & L861Q, mélange insertions & G719X, mélange L858R & C797S, mélange délétions & S768I, mélange principal pour PCR, contrôle positif <i>EGFR</i> , eau sans RNase/DNase	874611
Rotor-Gene Q et accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cycleur de real-time PCR et analyseur de fusion haute résolution à 5 canaux (Green, Yellow, Orange, Red, Crimson) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation incluses	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cycleur de real-time PCR et analyseur de fusion haute résolution à 5 canaux (Green, Yellow, Orange, Red, Crimson) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation non incluses	9002032
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
72-Well Rotor	Maintient en place les Strip Tubes and Caps, 0,1 ml, un Locking Ring 72-Well Rotor est nécessaire	9018903

<b>Produit</b>	<b>Table des matières</b>	<b>N° de réf.</b>
Locking Ring 72-Well Rotor	Maintient en place les Strip Tubes and Caps, 0,1 ml dans le 72-Well Rotor	9018904
Rotor Holder	Support métallique autonome pour assembler les tubes et les disques Rotor-Discs® dans les rotors	9018908
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 barrettes de 4 tubes avec bouchon pour 1 000 réactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 × 250 barrettes de 4 tubes avec bouchon pour 10 000 réactions	981106
Rotor-Gene AssayManager v2.1	Logiciel pour tests de routine associé aux instruments Rotor-Gene Q et Rotor-Gene Q MDx	9024203
Rotor-Gene AssayManager v2.1 License (1)	Licence unique pour l'installation du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 sur un ordinateur	9025620
<b>QIASymphony SP*</b>		
QIASymphony SP System	Module de préparation des échantillons du système QIASymphony : installation et formation incluses, garantie de 1 an pièces et main-d'œuvre	9001751
QIASymphony SP	Module de préparation d'échantillons QIASymphony : garantie de 1 an pièces et main-d'œuvre	9001297
<b>Produits associés</b>		
Deparaffinization Solution (16 ml)	Deparaffinization Solution 2 × 8 ml	19093

\* Pour les accessoires du QIASymphony SP, consultez les manuels correspondants.

Produit	Table des matières	N° de réf.
Deparaffinization Solution (50 ml)	Deparaffinization Solution 1 x 50 ml	939018
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pour 50 préparations d'ADN : 50 colonnes QIAamp MinElute®, protéinase K, tampons et Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Pour 50 préparations : colonnes QIAamp Mini, tampons, ADN entraîneur, QIAGEN Proteinase K et tubes	61504
QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Pour 192 préparations de 200 µl chacune : 2 cartouches de réactifs, portoirs de tubes d'enzyme et accessoires inclus	937236
QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	Cartouches de réactifs, accessoires et flacons de protéinase K pour 192 préparations de 2 000 µl ou 4 000 µl chacune	937556
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml ; 7 000 unités/ml, solution)	19101
Buffer ATL (4 x 50ml)	Tampon de lyse 4 x 50 ml	939016

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

---

## Historique des révisions du document

Révision	Description
R1, mars 2022	Première version

---

Cette page est intentionnellement laissée vierge

### Contrat de licence limitée pour le *therascreen*<sup>®</sup> EGFR Plus RGQ PCR Kit

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

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

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

L'achat de ce produit permet à l'acquéreur de l'utiliser afin d'effectuer des diagnostics in vitro humains. Aucun brevet général ni licence d'aucune sorte autre que ce droit spécifique d'utilisation à l'achat n'est accordé par la présente.

Marques de commerce : QIAGEN<sup>®</sup>, Sample to Insight<sup>®</sup>, *therascreen*<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, QIASymphony<sup>®</sup>, MinElute<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup>, Rotor-Gene AssayManager<sup>®</sup>, Rotor-Disc<sup>®</sup> (Groupe QIAGEN) ; CAL Fluor<sup>®</sup> (Biosearch Technologies, Inc.) ; FAM<sup>™</sup>, HEX<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc).

Mar-2022 HB-2963-001 1126175 © 2022 QIAGEN, tous droits réservés.

