

Manuel du kit *therascreen*[®] EGFR Pyro[®] 24

Version 1



Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro.



 971480

 1061827FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

ALEMAGNE

R3  1061827FR



Technologies d'échantillonnage et de dosage QIAGEN

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillonnage et de dosage permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services avancés de haute qualité garantissent le succès, de l'échantillon jusqu'au résultat.

QIAGEN fixe les normes en matière de :

- purification d'ADN, d'ARN et de protéines
- dosages d'acides nucléiques et de protéines
- recherche micro-ARN et ARNi
- automatisation des technologies d'échantillonnage et de dosage

Notre mission consiste à permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter www.qiagen.com.

Contenu

Utilisation prévue	5
Résumé et explication	5
Principe de la procédure	6
Matériel fourni	9
Contenu du kit	9
Matériel nécessaire mais non fourni	11
Avertissements et précautions	12
Informations de sécurité	12
Précautions générales	13
Stockage et manipulation des réactifs	14
Stockage et manipulation des prélèvements	15
Procédure	16
Isolement d'ADN	16
Protocoles	
■ 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24	17
■ 2 : PCR à l'aide des réactifs fournis avec le kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro	20
■ 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance)	23
■ 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24	25
■ 5 : Mettez sous tension le PyroMark Q24	30
■ 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24	33
Interprétation des résultats	37
Interprétation des résultats d'analyse et détection des mutations de faible niveau	37
Guide de dépannage	43
Contrôle qualité	47
Limitations	48
Caractéristiques des performances	49
Limite du blanc et limite de détection	49
Linéarité	52
Précision	53

Évaluation diagnostique	53
Références	58
Symboles	59
Coordonnées	59
Annexe A : Préparation des tests <i>therascreen</i> EGFR Pyro	60
Annexe B : Vidange du conteneur à déchets et des cuves	65
Pour commander	67

Utilisation prévue

Le kit *therascreen* EGFR Pyro est un test in vitro de détection basé sur les séquences d'acide nucléique et s'appuyant sur le Pyrosequencing[®], ou pyroséquençage, pour la détection quantitative des mutations au niveau des exons 18, 19, 20 et 21 du gène EGFR humain dans l'ADN génomique provenant d'échantillons de tissu humain.

Le kit *therascreen* EGFR Pyro vise à fournir aux cliniciens des informations pour les aider à sélectionner les patients atteints de cancer les plus à même de bénéficier d'une thérapie anti-EGFR. Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro.

À utiliser uniquement avec le système PyroMark[®] Q24. Les systèmes PyroMark Q24 comprennent les appareils suivants :

- Les instruments PyroMark Q24 et PyroMark Q24 MDx
- Les stations de travail sous vide PyroMark Q24 et PyroMark Q24 MDx
- Les logiciels (version 2.0) PyroMark Q24 et PyroMark Q24 MDx (version 2.0)

Le produit est destiné à être utilisé par des professionnels, tels que des techniciens ou des médecins formés aux procédures de diagnostics in vitro, aux techniques de biologie moléculaire et au système PyroMark Q24.

Résumé et explication

Le kit *therascreen* EGFR Pyro permet la mesure quantitative des mutations au niveau des codons 719, 768, 790 et 858–861, ainsi que celle des délétions et des mutations complexes au niveau de l'exon 19 du gène EGFR humain.

Le kit comporte quatre analyses de PCR (figure 1) pour la détection :

- des mutations au niveau du codon 719 (exon 18) ;
- des mutations au niveau des codons 768 et 790 (exon 20) ;
- des mutations au niveau des codons 858 à 861 (exon 21) ;
- des délétions et des mutations complexes au niveau de l'exon 19.

Les quatre régions sont amplifiées séparément par PCR et séquencées dans la région définie. L'amplicon couvrant les codons 768 et 790 est divisé en deux réactions de séquençage. Les séquences entourant les positions définies servent de valeurs maximales de normalisation et de référence pour l'évaluation quantitative et qualitative de l'analyse.

Tous les tests sont séquencés dans le sens direct.

Le produit contient un mélange d'amorce PCR et des amorces de séquence pour chaque test. Les amorces sont livrées en solution. Chaque fiole contient 24 μ L de chaque amorce ou mélange d'amorce.

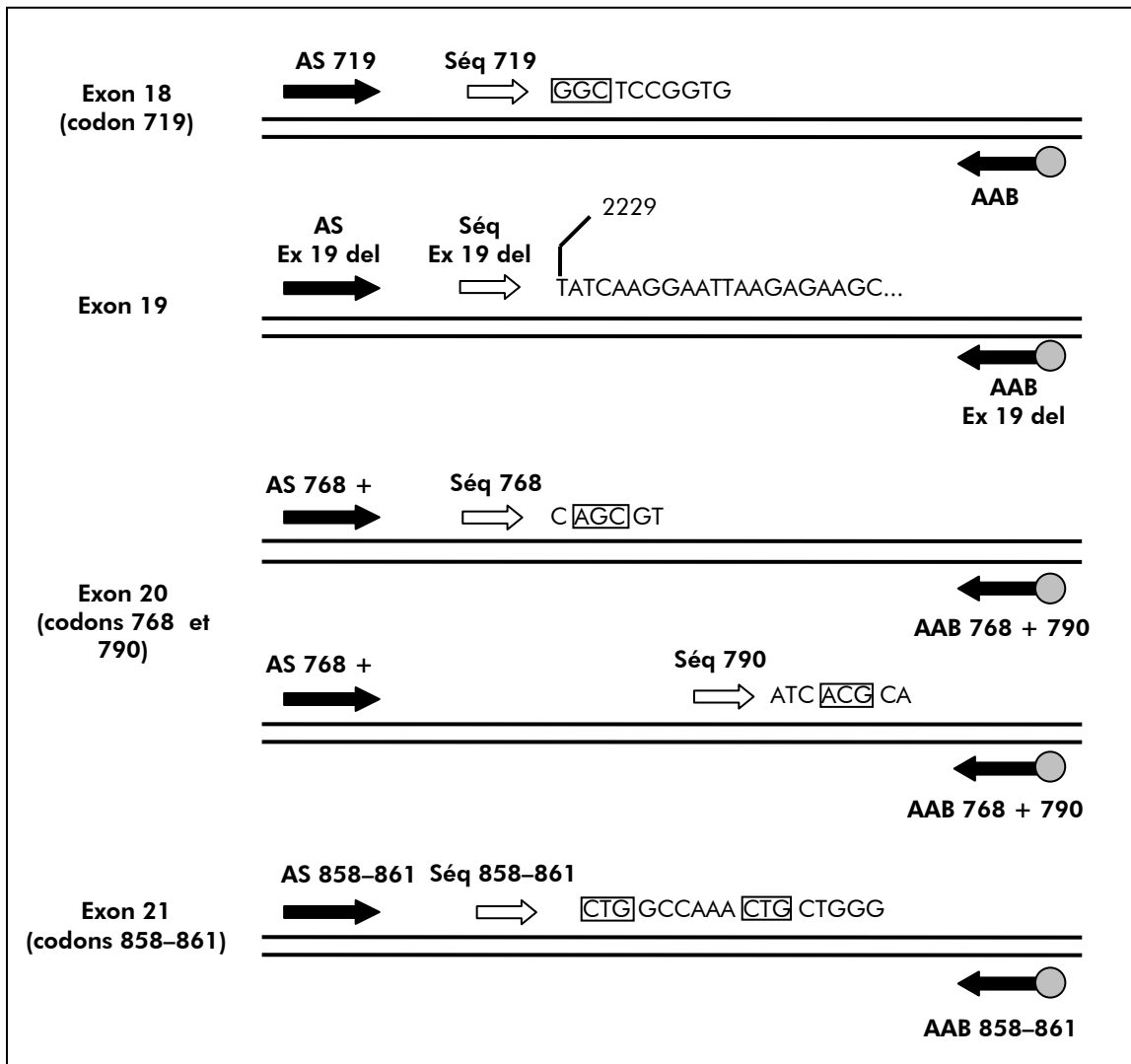


Figure 1. Illustration du test EGFR. La séquence indiquée est la séquence analysée pour un échantillon de type sauvage. **AS** : amorces PCR sens ; **AAB** : amorces PCR antisens (B indique une biotinylation) ; **Séq** : amorces de séquence.

Principe de la procédure

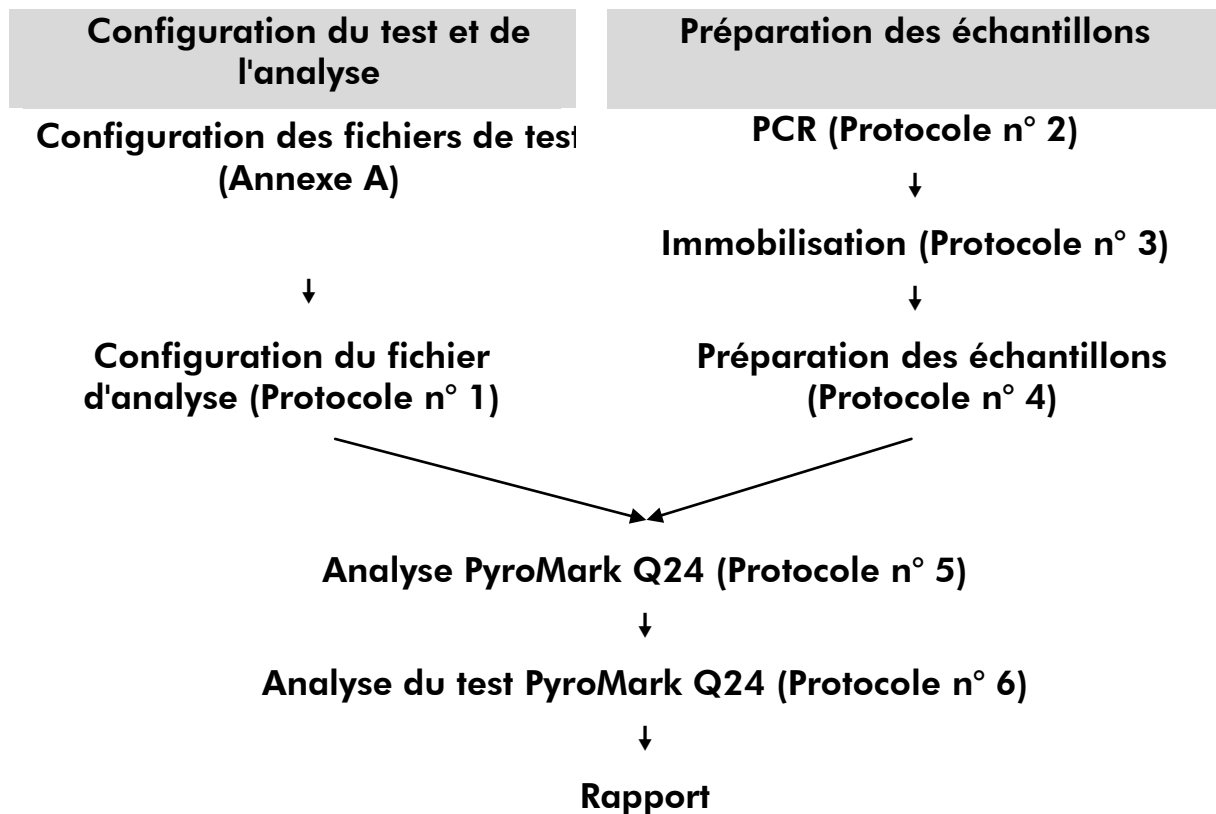
Le déroulement des opérations ci-dessous illustre la procédure de test. Après l'utilisation des amorces PCR ciblant les exons 18, 19, 20 et 21, les amplicons sont immobilisés sur des billes de sépharose recouvertes de streptavidine (Streptavidin Sepharose® High Performance). L'ADN simple brin est préparé et les amorces de séquence correspondantes s'hybrident avec l'ADN. Les échantillons sont ensuite analysés sur le système PyroMark Q24 à l'aide d'un fichier de configuration d'analyse et d'un fichier d'analyse.

Il est recommandé d'utiliser l'EGFR Plug-in Report pour analyser le test. Vous pouvez obtenir l'EGFR Plug-in Report par e-mail en écrivant à l'adresse pyro.plugin@qiagen.com.

Toutefois, le test peut également être analysé à l'aide de l'outil d'analyse intégré au système PyroMark Q24. La « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) peut alors être adaptée pour la détection de différentes délétions au niveau de l'exon 19 et de mutations rares au niveau des autres exons après l'analyse (voir « Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24 », page 33).

Remarque : Le déroulement des opérations a été légèrement modifié par rapport à la révision R1 du *Manuel du kit theascreen EGFR Pyro* (voir « Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24 », page 25).

Déroulement de la procédure *thearscreen* EGFR Pyro



Contrôles

L'ADN de contrôle non méthylé est inclus dans le kit en tant que témoin positif pour les réactions de PCR et de séquençage. Cet ADN de contrôle comporte un génotype sauvage dans les régions séquencées à l'aide de ce kit. Il est requis pour l'interprétation correcte des résultats et l'identification des mutations de faible niveau (voir « Interprétation des résultats », page 37). Incluez un échantillon avec ADN de contrôle non méthylé dans chaque test réalisé au cours des analyses de pyroséquençage.

En outre, un témoin négatif (sans ADN matrice) doit être inclus dans chaque configuration PCR pour au moins un test.


Matériel fourni

Contenu du kit

Kit *therascreen* EGFR Pyro (boîte 1/2)

Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro	(24)
N° de référence	971480
Nombre de réactions	24
Amorce Séq EGFR 719	24 µL
Amorce Séq EGFR Ex 19 Del	24 µL
Amorce Séq EGFR 768	24 µL
Amorce Séq EGFR 790	24 µL
Amorce Séq EGFR 858–861	24 µL
Amorce PCR EGFR 719	24 µL
Amorce PCR EGFR Ex19 Del	24 µL
Amorce PCR EGFR 768+790	24 µL
Amorce PCR EGFR 858–861	24 µL
Master Mix PCR PyroMark, 2x	2 x 850 µL
CoralLoad® concentré, 10x	1,2 mL
H ₂ O	5 x 1,9 mL
ADN de contrôle non méthylé, 10 ng/µL	100 µL

Tampons et réactifs *therascreen* (boîte 2/2)

Tampons et réactifs <i>therascreen</i>		
Tampon de liaison PyroMark		2 x 10 mL
Tampon d'hybridation PyroMark		2 x 10 mL
Solution de dénaturation PyroMark*		2 x 250 mL
Tampon de lavage PyroMark concentré 10x		2 x 25 mL
Mélange d'enzymes		2 flacons
Mélange de substrats		2 flacons
dATP α S		2 x 1180 μ L
dCTP		2 x 1180 μ L
dGTP		2 x 1180 μ L
dTTP		2 x 1180 μ L
Manuel		1

* Contient de l'hydroxyde de sodium.

Matériel nécessaire mais non fourni

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

- Kit d'isolement d'ADN (voir « Isolement d'ADN », page 16)
- Pipettes (adaptables)*
- Pointes de pipettes stériles (avec des filtres pour la configuration PCR)
- Microcentrifugeuse de paillasse*
- Thermocycleur* et tubes de PCR adéquats
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, n° réf. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (n° réf. 9001513 or 9001514)*†
- Logiciel PyroMark Q24 (n° réf. 9019063 ou 9019062)†
- Plaque PyroMark Q24 (n.° réf. 979301)†
- Cartouche PyroMark Q24 (n.° réf. 979302)†
- Station de travail sous vide PyroMARK Q24 (n.° réf. 9001515 ou 9001517)*†
- Bloc chauffant* capable d'atteindre les 80 °C.
- Plaques de PCR à 24 puits ou barrettes de PCR
- Capuchons de barrette
- Eau ultra-pure (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm ou équivalent).

Remarque : le kit contient de l'eau en quantité suffisante pour la PCR, pour l'immobilisation de l'ADN et pour dissoudre le mélange d'enzymes et le mélange de substrats ; une quantité supplémentaire d'eau ultra-pure est requise pour diluer le tampon de lavage PyroMark concentré 10x.

- Éthanol (70 %)‡

* Assurez-vous que les instruments ont été vérifiés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

† Certifié CE-IVD conformément à la directive européenne 98/79/CE. Tous les autres produits de la liste ne sont pas certifiés CE-IVD conformément à la directive européenne 98/79/CE.

‡ N'utilisez pas d'alcool dénaturé, qui contient d'autres substances, telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone.

Agitateurs de plaques recommandés

Les agitateurs de plaques répertoriés dans le tableau 1 sont recommandés avec le kit *therascreen* EGFR Pyro.

Tableau 1. Les agitateurs de plaques répertoriés dans le tableau 1 sont recommandés avec le kit *therascreen* EGFR Pyro.

Fabricant	Produit	Numéro de référence
Eppendorf	Thermomixer confort (appareil de base)	5355 000.011
	Thermobloc pour plaques MTP	5363 000.012
	Adaptateur pour tubes PCR 96 x 0,2 mL pour thermobloc à plaques MTP	5363 007.009
H+P Labortechnik Gmbh	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag® Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

Informations de sécurité

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

Les mentions de danger et conseils de prudence suivants s'appliquent aux composants du kit *therascreen* EGFR Pyro.

PyroMark Denaturation Solution



Attention! Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut être corrosif pour les métaux. Absorber toute substance répandue pour éviter qu'elle attaque les matériaux environnants. Conserver uniquement dans le récipient d'origine. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

PyroMark Enzyme Mixture



Contient: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Danger! Provoque une irritation cutanée. Provoque des lésions oculaires graves. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. En cas d'exposition prouvée ou suspectée: Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

PyroMark Substrate Mixture



Contient: acetic acid. Attention! Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

Précautions générales

Remarque : L'utilisateur doit toujours faire attention aux éléments suivants.

- Pour obtenir des résultats optimaux, veuillez vous conformer au manuel de l'utilisateur de manière rigoureuse. Il n'est pas recommandé de diluer les réactifs d'une autre manière que celle décrite dans ce manuel dans la mesure où les performances en seraient affectées.
- Le déroulement des opérations a été légèrement modifié (voir «Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de

pyroséquençage sur le PyroMark Q24 », page 25) par rapport à la révision R1 du *Manuel du kit theascreen EGFR Pyro*.

- Les composants de ce produit suffisent pour réaliser 24 réactions au cours de cinq analyses indépendantes maximum.
- Utilisez des pointes de pipettes stériles avec des filtres (pour la configuration PCR).
- Conservez et procédez à l'extraction du matériel positif (prélèvements, témoins positifs et amplicons) séparément de tous les autres réactifs puis ajoutez-les au mélange réactionnel dans un emplacement suffisamment distant.
- Décongelez complètement tous les composants à température ambiante (de 15 à 25 °C) avant de commencer un test.
- Une fois qu'ils sont décongelés, mélangez les composants (en pipetant l'ensemble de manière répétée ou en les passant à l'agitateur à pulsations multiples) et passez-les brièvement à la centrifugeuse.
- La détermination du statut mutationnel ne doit jamais être basée sur des résultats marqués « Failed » (échec).

Stockage et manipulation des réactifs

Le kit *theascreen EGFR Pyro* est expédié dans deux boîtes. Le kit *theascreen EGFR Pyro* (boîte 1/2) est expédié sur un lit de carboglace. Le Master Mix PCR PyroMark, le concentré CoralLoad, l'ADN de contrôle non méthylé et toutes les amorces doivent être stockés dès leur réception entre –30 et –15°C.

Les tampons et réactifs *theascreen* (boîte 2/2) contenant les tampons, le mélange d'enzymes, le mélange de substrats, la dATP α S, la dCTP, la dGTP et la dTTP (les réactifs pour l'analyse de pyroséquençage ou Pyrosequencing®) sont expédiés sur des pains de glace. Ces composants doivent être stockés dès leur réception entre 2 et 8 °C. Pour minimiser la perte d'activité, il est recommandé de garder les mélanges d'enzymes et de substrats dans les fioles fournies.

Les mélanges d'enzymes et de substrats reconstitués sont stables pendant au moins 10 jours s'ils sont conservés entre 2 et 8 °C. Les mélanges d'enzymes et de substrats reconstitués peuvent être congelés et stockés dans leur flacon entre –30 et –15°C. Les réactifs congelés ne doivent pas subir plus de 3 cycles de congélation/décongélation.

Remarque : les nucléotides ne doivent pas être congelés.

Le kit *theascreen EGFR Pyro* est stable jusqu'à la date de péremption du kit s'il est stocké conformément à ces conditions.

Stockage et manipulation des prélèvements

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

Les prélèvements contiennent de l'ADN humain extrait de sang ou d'échantillons fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE).

Les échantillons provenant de patients suivant un traitement à l'héparine ne doivent pas être utilisés. Les échantillons sanguins qui ont été collectés dans des tubes contenant de l'héparine agissant en tant qu'anticoagulant ne doivent pas être utilisés. L'héparine affecte la PCR.

Procédure

Isolement d'ADN

Les performances du système ont été établies à l'aide du kit EZ1[®] DNA Tissue et du kit QIAamp[®] DNA FFPE Tissue pour l'extraction d'ADN humain provenant d'échantillons de tumeurs fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine. Pour le système QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit, les performances ont été établies à l'aide d'échantillons de sang de donneur en bonne santé partiellement enrichis en cellules cancéreuses.

Les kits de QIAGEN[®] apparaissant dans le tableau 2 sont recommandés pour la purification de l'ADN provenant des échantillons de type humain destinés à être utilisés avec le kit *therascreen* EGFR Pyro. Effectuez la purification de l'ADN conformément aux instructions des manuels du kit.

Tableau 2. Kits de purification de l'ADN recommandés pour l'utilisation avec le kit *therascreen* EGFR Pyro

Substances des échantillons	Kit d'isolement de l'acide nucléique	Numéro de référence (QIAGEN)
Tissu inclus en paraffine	Kit QIAamp DNA FFPE Tissue (50)	56404
	Kit EZ1 DNA Tissue (48)*	953034
Sang	Kit QIAamp DSP DNA Blood Mini [†]	61104

* Suivez le protocole d'utilisation du tissu inclus en paraffine. Le kit EZ1 DNA Tissue doit être utilisé en combinant l'utilisation du EZ1 Advanced (n° réf. 9001410 ou 9001411) et du EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (n° réf. 9018298), du EZ1 Advanced XL (n° réf. 9001492) et du EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (n° réf. 9018700) ou du BioRobot[®] EZ1 (n° réf. 9000705, n'est plus disponible) et du EZ1 DNA Paraffin Section Card (n° réf. 9015862).

[†] Certifié CE-IVD conformément à la directive européenne 98/79/CE.

Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24

Point important avant de commencer

- Si nécessaire, la LoB peut être confirmée à l'aide d'un échantillon de type sauvage pour générer une plaque entière de résultats. Pour obtenir des détails, consultez le protocole EP17-A du CLSI « Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline ».

À effectuer avant de commencer

- Si l'EGFR Plug-In Report n'a pas été installé, créez une configuration de test (voir l'Annexe A, page 60). Cette configuration n'est nécessaire qu'une seule fois, avant les premiers tests *therascreen* EGFR Pyro. Si l'EGFR Plug-in Report a été installé, des configurations de test prédéfinies sont disponibles dans le raccourci du navigateur du logiciel PyroMark Q24, sous « Example Files/PyroMark Setups/EGFR ». Vous pouvez obtenir l'EGFR Plug-in Report par e-mail en écrivant à l'adresse pyro.plugin@qiagen.com.

Procédure

1. Cliquez sur dans la barre d'outils.

Un nouveau fichier d'analyse est créé.

2. Entrez les paramètres de l'analyse (voir « Paramètres de l'analyse », page 19).

3. Préparez la plaque en ajoutant des tests pour les 5 différentes réactions de séquençage aux puits correspondant aux échantillons à analyser.

Remarque : un échantillon de témoin négatif (sans ADN matrice) doit être inclus dans chaque configuration PCR pour au moins un test.

Remarque : Incluez un échantillon avec ADN de contrôle non méthylé dans chaque test réalisé au cours des analyses de pyroséquençage (voir « Contrôles », page 12).

4. Lorsque l'analyse est paramétrée et prête à être effectuée sur le système PyroMark Q24, imprimez la liste des volumes requis de mélange d'enzymes, de mélange de substrats et de nucléotides, ainsi que la liste du paramétrage de la plaque. Sélectionnez « Pre Run Information » (informations pré-analyse) dans le menu « Tools » (outils), puis lorsque le rapport apparaît, cliquez sur .

5. Fermez le fichier d'analyse et copiez-le sur une clé USB (fournie avec le système) à l'aide de Windows® Explorer.

Remarque : Les informations de pré-analyse imprimées peuvent être utilisées comme modèle pour le paramétrage des échantillons (voir «Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance)», page 23).

Pour analyser la plaque sur le système PyroMark Q24, voir « Protocole 5 : Mettez sous tension le PyroMark Q24 », page 30.

Paramètres de l'analyse

- « Run name » (Nom de l'analyse) : Le nom de l'analyse est donné lorsque le fichier est sauvegardé. Lorsque vous renommez le fichier, le nom de l'analyse change également.
- « Instrument method » (Méthode de l'instrument) : Sélectionnez la méthode de l'instrument conformément à la cartouche qui sera utilisée pour l'analyse. Voir les instructions fournies avec les produits.
- « Plate ID » (Identifiant de plaque) : **Optionnel** : entrez l'identifiant de la plaque PyroMark Q24.
- « Bar code » (Code-barres) : **Optionnel** : entrez un numéro de code-barres pour la plaque ou, si vous avez un lecteur de code-barres connecté à votre ordinateur, placez le curseur de la souris dans la zone de texte « Barcode » (code-barres) et scannez le code-barres.
- « Kit and Reagent ID » (Identifiant du réactif et du kit) : **Optionnel** : Entrez le numéro de lot du kit *therascreen EGFR Pyro* à utiliser. Le numéro de lot se trouve sur l'étiquette du produit.
Remarque : Nous recommandons d'entrer les identifiants du réactif et du kit pour pouvoir remonter à la source de tout problème inattendu lié aux réactifs.
- « Run note » (Remarque à propos de l'analyse) : **Optionnel** : entrez une remarque à propos des contenus ou des objectifs de l'analyse.

Ajouter des fichiers de test

Pour ajouter un test à un puits, vous avez deux solutions :

- Faites un clic droit sur le puits et sélectionnez « Load Assay » (charger le test) dans le menu contextuel.
- Sélectionnez le test dans le raccourci du navigateur puis cliquez sur le test et faites-le glisser jusqu'au puits.

Il existe un code de couleurs selon la nature du test chargé sur le puits.

Entrez les identifiants et les remarques liées à l'échantillon

Pour entrer un identifiant ou une remarque liée à l'échantillon, sélectionnez la cellule et saisissez le texte.

Pour modifier un identifiant ou une remarque liée à l'échantillon, sélectionnez la cellule (le contenu actuel sera sélectionné) ou double-cliquez dessus.

Protocole 2 : PCR à l'aide des réactifs fournis avec le kit *therascreen* EGFR Pyro

Ce protocole est utilisé pour 4 amplifications de PCR séparées de régions contenant le codon 719 (exon 18), les codons 768 et 790 (exon 20), les codons 858–861 (exon 21) ou pour des délétions et mutations complexes au niveau de l'exon 19 à l'aide des amorces de *therascreen* EGFR Pyro.

Points importants avant de commencer

- La HotStarTaq® ADN polymérase contenue dans le Master Mix PyroMark PCR requiert une étape d'activation **à 95 °C pendant 15 minutes**.
- Préparez tous les mélanges réactionnels dans une zone séparée de celle utilisée pour la purification de l'ADN, l'ajout d'ADN matrice à la PCR, l'analyse du produit PCR ou la préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage.
- Utilisez des pointes jetables contenant des filtres hydrophobes pour minimiser la contamination croisée.

À effectuer avant de commencer

- Avant d'ouvrir les tubes avec les amorces PCR, passez-les brièvement à la centrifugeuse pour rassembler le contenu au fond des tubes.
- Si nécessaire, réglez la concentration de l'ADN témoin et de celui de l'échantillon entre 0,4 et 2 ng/μL.

Procédure

- 1. Décongelez tous les composants nécessaires (voir tableau 3).**
Mélangez-les bien avant de les utiliser.
- 2. Préparez un mélange réactionnel pour chaque ensemble d'amorces PCR conformément au tableau 3.**

Le mélange réactionnel contient généralement tous les composants nécessaires à la PCR excepté l'échantillon.

Préparez un volume de mélange réactionnel supérieur à ce qui est nécessaire pour le nombre total d'analyses de PCR à effectuer.

Tableau 3. Préparation du mélange réactionnel pour chaque mélange d'amorce PCR

Composant	Volume/réaction (µL)
Master Mix PCR PyroMark, 2x	12,5
CoralLoad concentré 10x	2,5
Amorce PCR EGFR 719 ou amorce PCR EGFR Ex19 Del ou amorce PCR EGFR 768 et 790 ou amorce PCR EGFR 858–861	1,0
Eau (H ₂ O, fournie)	4,0
Volume total	20,0

3. Mélangez complètement le mélange réactionnel et distribuez-en 20 µL dans chaque tube de PCR.

Il n'est pas nécessaire de garder les tubes de PCR sur un lit de glace étant donné que la HotStarTaq ADN polymérase est inactive à température ambiante.

4. Ajoutez 5 µL d'ADN matrice (entre 2 et 10 ng d'ADN génomique) aux tubes de PCR individuels (voir le tableau 4) et mélangez bien.

Remarque : un échantillon de témoin négatif (sans ADN matrice) doit être inclus dans chaque configuration PCR pour au moins un test.

Remarque : Incluez un échantillon avec ADN de contrôle non méthylé dans chaque test réalisé au cours des analyses de pyroséquençage (voir « Contrôles », page 7).

Tableau 4. Préparation de la PCR

Composant	Volume/réaction (µL)
Mélange réactionnel	20
ADN de l'échantillon	5
Volume total	25

5. **Programmez le thermocycleur conformément aux instructions du fabricant à l'aide des conditions décrites dans le tableau 5.**

Tableau 5. Protocole de cycle optimisé

			Commentaires
Étape d'activation initiale :	15 minutes	95 °C	La HotStarTaq ADN polymérase est activée par cette étape de réchauffement.
Cycle en 3 étapes :			
Dénaturation	20 secondes	95 °C	
Hybridation	30 secondes	53 °C	
Extension	20 secondes	72 °C	
Nombre de cycles	42		
Extension finale :	5 minutes	72 °C	

6. **Placez les tubes de PCR dans le thermocycleur et démarrez le programme de cycle.**
7. **Après l'amplification, continuez avec le « Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance) », page 23.**

Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance)

Ce protocole est utilisé pour l'immobilisation de l'ADN matrice sur la sépharose-streptavidine haute performance (GE Healthcare) avant l'analyse sur le système PyroMark Q24.

À effectuer avant de commencer

- Laissez les réactifs et les solutions nécessaires atteindre la température ambiante (entre 15 et 25 °C) avant de commencer.

Procédure

1. Agitez doucement le flacon contenant la sépharose-streptavidine haute performance jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.
2. Préparez un master mix pour l'immobilisation de l'ADN conformément au tableau 6. Préparez un volume de 10 % supérieur à ce qui est nécessaire pour le nombre total de réactions à effectuer.

Tableau 6. Master mix pour l'immobilisation de l'ADN

Composant	Volume/échantillon (µL)
Sépharose streptavidine haute performance	2
Tampon de liaison PyroMark	40
Eau (H ₂ O, fournie)	28
Volume total	70

3. Ajoutez 70 µL du master mix aux puits d'une plaque de PCR à 24 puits ou de barrettes tel que prédéfini dans la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 17).
4. Ajoutez 10 µL de produit PCR biotinylé provenant du Protocole n° 2 à chaque puits contenant le master mix tel que prédéfini dans la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 17).

Remarque : Le volume total par puits doit être de 80 µL après l'ajout du master mix et du produit PCR.

- 5. Scellez la plaque (ou les barrettes) de PCR à l'aide des capuchons de barrette.**

Remarque : Assurez-vous qu'aucune fuite entre les puits n'est possible.

- 6. Agitez la plaque de PCR à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pendant 5 à 10 minutes à 1 400 tr/min.**

Remarque : Pendant ce temps, préparez la station de travail sous vide PyroMark Q24 pour la préparation des échantillons, tel que décrit dans le *PyroMark Q24 User Manual* (Manuel d'utilisation du PyroMark Q24).

- 7. Commencez immédiatement le « Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24 », page 25.**

Remarque : les billes de sépharose se déposent rapidement. La capture des billes doit se faire immédiatement après l'agitation.

S'il s'est écoulé plus d'une minute depuis l'agitation de la plaque (ou des barrettes), agitez-la à nouveau pendant 1 minute avant de capturer les billes.

Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24

Ce protocole est utilisé pour la préparation de l'ADN simple brin et l'hybridation de l'amorce de séquence à l'ADN matrice avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24.

Points importants avant de commencer

- Avant d'ouvrir les tubes avec les amorces de séquence, passez-les brièvement à la centrifugeuse pour rassembler le contenu au fond des tubes.
- Ajoutez les 5 amorces de séquences différentes de la même manière que ce qui est prédéfini pour la plaque dans la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 17), selon la région de l'analyse (codon 719 [exon 18], codons 768 et 790 [exon 20], codons 858–861 [exon 21] ou exon 19).
- Le déroulement des opérations a été légèrement modifié par rapport à la révision R1 du *Manuel du kit theascreen EGFR Pyro* (étape 18). Ne raccourcissez pas le temps de refroidissement des échantillons après le réchauffement à 80 °C.
- Testez régulièrement le fonctionnement des sondes à filtre, tel que décrit dans le Manuel d'utilisation du PyroMark Q24, et remplacez-les aux échéances indiquées.

À effectuer avant de commencer

- Placez un portoir de plaque PyroMark Q24 sur un bloc chauffant préchauffé à 80 °C pour l'étape 17. Laissez un second portoir de plaque PyroMark Q24 à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pour l'étape 18.
- Le tampon de lavage PyroMark est fourni en tant que concentré 10x. Avant de l'utiliser pour la première fois, diluez pour obtenir une solution de travail concentrée 1x en ajoutant 225 mL d'eau ultra-pure à 25 mL de tampon de lavage PyroMark concentré 10x (volume final de 250 mL).

Remarque : la solution de travail tampon de lavage PyroMark concentrée 1x est stable entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée.

Procédure

1. Diluez une quantité suffisante de chaque amorce de séquence (amorce Séq EGFR 719, amorce Séq EGFR 768, amorce Séq EGFR 790, amorce Séq EGFR 858–861 et amorce Séq EGFR Exon 19

Del) dans le tampon d'hybridation PyroMark tel que décrit dans le tableau 7.

Préparez un volume d'amorce de séquence diluée supérieur à ce qui est requis pour le nombre total d'échantillons à séquencer (pour le nombre d'échantillons + un supplémentaire).

Tableau 7. Exemple de dilution pour les amorces de séquence

Composant	Volume/échantillon (μL)	Volume pour 9 + 1 réactions (μL)
Amorce Séq EGFR 719 ou Amorce Séq EGFR Ex 19 Del ou amorce Séq EGFR 768 ou amorce Séq EGFR 790 ou amorce Séq EGFR 858–861	0,8	8
Tampon d'hybridation PyroMark	24,2	242
Volume total	25	250

- Ajoutez 25 μ L d'amorce de séquence diluée à chaque puits de la plaque PyroMark Q24 conformément à la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 17).**

Remarque : Gardez l'un des portoirs de plaque PyroMark Q24 (fournis avec la station de travail sous vide PyroMark Q24) à température ambiante (entre 15 et 25 °C) et utilisez-le lors de la préparation et du déplacement de la plaque.

- Placez la plaque (ou les barrettes) de PCR du Protocole n° 3 et la plaque PyroMark Q24 sur la table de travail (figure 2).**

Remarque : Assurez-vous que la plaque est orientée de la même façon que lors du chargement des échantillons.



Figure 2. Placement de la plaque (ou des barrettes) de PCR et de la plaque PyroMark Q24 sur la station de travail sous vide.

4. Mettez l'outil sous vide en activant la commande de vide.
5. Plongez minutieusement les sondes à filtre de l'outil à vide dans la plaque (ou les barrettes) de PCR pour capturer les billes contenant l'ADN matriciel immobilisé. Maintenez les sondes en place pendant 15 secondes. Prenez garde lorsque vous retirez l'outil à vide.

Remarque : les billes de sépharose se déposent rapidement. La capture des billes doit se faire immédiatement après l'agitation.

S'il s'est écoulé plus d'une minute depuis l'agitation de la plaque (ou des barrettes), agitez-la à nouveau pendant 1 minute avant de capturer les billes.

6. Transférez l'outil à vide dans la cuve contenant 40 mL d'éthanol à 70 % (figure 2). Purgez les sondes à filtre pendant 5 secondes.
7. Transférez l'outil à vide dans la cuve contenant 40 mL de solution de dénaturation (figure 2). Purgez les sondes à filtre pendant 5 secondes.
8. Transférez l'outil à vide dans la cuve contenant 50 mL de tampon de lavage (figure 2). Purgez les sondes à filtre pendant 10 secondes.
9. Secouez l'outil à vide de haut en bas à plus de 90° par rapport à l'horizontale pendant 5 secondes pour égoutter le liquide présent dans les sondes à filtre (figure 3).

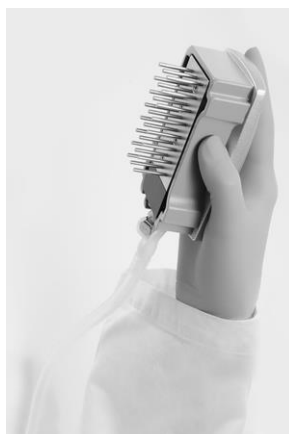


Figure 3. Illustration de l'outil à vide à plus de 90° par rapport à l'horizontale.

10. Fermez la commande de vide de l'outil (« Off ») avec l'outil à vide maintenu au-dessus de la plaque PyroMark Q24.
11. Libérez les billes de la plaque PyroMark Q24 en plongeant les sondes à filtre dans l'amorce de séquence diluée et en secouant doucement l'outil latéralement.
Remarque : veillez à ne pas endommager la surface de la plaque PyroMark Q24 en l'éraflant avec les sondes à filtre.
12. Transférez l'outil à vide dans la cuve contenant l'eau ultra-pure (figure 2) et agitez-le pendant 10 secondes.
13. Lavez les sondes à filtre en les plongeant dans l'eau ultra-pure (figure 2) et en y appliquant le vide. Purgez les sondes avec 70 mL d'eau ultra-pure.
14. Secouez l'outil à vide de haut en bas à plus de 90° par rapport à l'horizontale pendant 5 secondes pour égoutter le liquide présent dans les sondes à filtre (figure 3).
15. Fermez la commande de vide de l'outil (« Off ») et placez l'outil à vide en position de repos (« P »).
16. Éteignez la pompe à vide.
Remarque : À la fin de votre journée de travail, les déchets liquides et les solutions restantes doivent être rejetés et vous devez vérifier qu'il n'y a pas de poussière et qu'aucun produit ne s'est répandu dans la station de travail sous vide PyroMark Q24, voir Annexe B, page 65.
17. Faites chauffer la plaque PyroMark Q24 avec les échantillons à 80 °C pendant 2 minutes à l'aide du portoir de plaque PyroMark Q24 préchauffé.
18. Retirez la plaque PyroMark Q24 du portoir de plaque chaud et placez-la pendant 10 à 15 minutes sur un second portoir de plaque PyroMark Q24 laissé à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pour que les échantillons reviennent à température ambiante.

19. Continuez avec le « Protocole 5 : Mettez sous tension le PyroMark Q24 », page 30.

Protocole 5 : Mettez sous tension le PyroMark Q24

Ce protocole décrit la préparation et le chargement des réactifs PyroMark Gold Q24 dans la cartouche PyroMark Q24 ainsi que le démarrage et la fin d'une analyse sur le PyroMark Q24. Pour obtenir une description détaillée de la préparation d'une analyse, voir le Manuel de l'utilisateur PyroMark Q24.

Point important avant de commencer

- Le rapport d'informations de pré-analyse, qui se trouve dans le menu « Tools » (outils) de la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 17), fournit des informations relatives au volume des nucléotides et des tampons d'enzyme et de substrat nécessaire pour une analyse spécifique.

À effectuer avant de commencer

- Mettez sous tension le PyroMark Q24. L'interrupteur d'alimentation se trouve à l'arrière de l'instrument.

Procédure

- 1. Dissolvez les mélanges d'enzyme et de substrat lyophilisés respectivement dans 620 µL d'eau (H₂O, fournie).**
- 2. Mélangez le flacon doucement.**
Remarque : ne le passez pas à l'agitateur !
Remarque : pour garantir la dissolution complète du mélange, laissez-le à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pendant 5 à 10 minutes. Assurez-vous que la solution n'est pas trouble avant de remplir la cartouche PyroMark Q24. S'il n'est pas prévu d'utiliser les réactifs dans l'immédiat, placez les flacons de réactifs sur un lit de glace* ou dans un réfrigérateur.
- 3. Laissez les réactifs et la cartouche PyroMark Q24 atteindre la température ambiante (20–25 °C).**
- 4. Placez la cartouche PyroMark Q24 de manière à ce que son étiquette soit orientée vers vous.**
- 5. Chargez la cartouche PyroMark Q24 avec les volumes appropriés de nucléotides et de mélanges d'enzymes et de substrats, conformément à la figure 4.**

Assurez-vous qu'aucune bulle d'air n'est transférée de la pipette vers la cartouche.

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

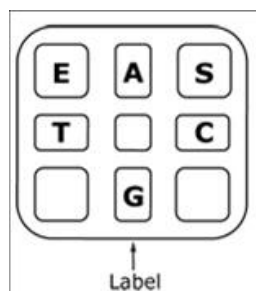


Figure 4. Illustration de la cartouche PyroMark Q24 vue du dessus. Les annotations correspondent à l'étiquette sur les flacons de réactifs. Ajoutez le mélange d'enzymes (**E**), le mélange de substrats (**S**) et les nucléotides (**A**, **T**, **C**, **G**) en fonction des informations de volume indiquées dans le rapport d'informations de pré-analyse, accessible dans le menu « Tools » de la configuration de l'analyse.

6. **Ouvrez le support de cartouche et insérez-y la cartouche remplie de réactifs avec l'étiquette vers l'extérieur. Poussez la cartouche entière à l'intérieur puis vers le bas.**
7. **Assurez-vous que la ligne est visible en face de la cartouche puis fermez la porte.**
8. **Ouvrez le dispositif porte-plaques et placez la plaque sur le bloc chauffant.**
9. **Fermez le dispositif porte-plaques et le couvercle de l'instrument.**
10. **Insérez la clé USB (contenant le fichier d'analyse) dans le port USB sur la face avant de l'instrument.**
Remarque : ne retirez pas la clé USB tant que l'analyse n'est pas terminée.
11. **Sélectionnez « Run » (analyse) dans le menu principal (à l'aide des boutons ▲ et ▼ de l'écran) puis appuyez sur « OK ».**
12. **Sélectionnez le fichier d'analyse à l'aide des boutons ▲ et ▼ à l'écran.**
Remarque : Pour visualiser le contenu d'un dossier, sélectionnez le dossier puis appuyez sur « Select » (sélectionner). Pour retourner à la page précédente, appuyez sur « Back » (retour).
13. **Lorsque le fichier d'analyse est sélectionné, appuyez sur « Select » (sélectionner) pour démarrer l'analyse.**
14. **Lorsque l'analyse est terminée et que l'instrument confirme que le fichier d'analyse a été enregistré sur la clé USB, appuyez sur « Close » (fermer).**
15. **Retirez la clé USB.**
16. **Ouvrez le couvercle de l'instrument.**
17. **Ouvrez la porte de la cartouche et sortez la cartouche de réactifs en la soulevant puis en la tirant vers l'extérieur.**
18. **Fermez la porte.**

- 19. Ouvrez le dispositif porte-plaques et retirez la plaque du bloc chauffant.**
- 20. Fermez le dispositif porte-plaques et le couvercle de l'instrument.**
- 21. Jetez la plaque et nettoyez la cartouche conformément aux instructions de la fiche produit fournie avec la cartouche.**
- 22. Analysez le test conformément au « Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24 », page 33.**

Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24

Ce protocole décrit l'analyse de la mutation d'un test EGFR terminé à l'aide du logiciel PyroMark Q24.

Procédure

1. Insérez la clé USB contenant le fichier de l'analyse effectuée dans le port USB de l'ordinateur.
2. Déplacez le fichier d'analyse depuis la clé USB vers l'endroit souhaité sur l'ordinateur à l'aide de Windows Explorer.
3. Ouvrez le fichier d'analyse en mode quantification des allèles sur le logiciel PyroMark Q24 soit en sélectionnant « Open » (ouvrir) dans le menu « File » (fichier), soit en double-cliquant sur le fichier (☑) dans le raccourci du navigateur.
4. Il existe 2 méthodes pour analyser le test. Si vous utilisez l'EGFR Plug-In Report, allez à l'étape 5. Si vous utilisez l'analyse de la quantification des allèles intégrée au système PyroMark Q24, allez à l'étape 6.

Remarque : nous recommandons fortement d'utiliser l'EGFR Plug-In Report pour l'interprétation des résultats. Vous pouvez obtenir l'EGFR Plug-in Report par e-mail en écrivant à l'adresse pyro.plugin@qiagen.com. Ce rapport garantit que les valeurs de LoD respectives et différentes fonctions « Sequences to Analyze » (séquences à analyser) sont utilisées pour détecter automatiquement toutes les mutations et délétions, y compris les 20 délétions différentes et les mutations complexes au niveau de l'exon 19.

5. Utilisation de l'EGFR Plug-In Report :

Sélectionnez « AQ Add On Reports/EGFR » (rapports de l'option quantification des allèles/EGFR) et « Exon 18 Codon 719 », « Exon 19 Deletions » (délétions au niveau de l'exon 19), « Exon 20 Codon 768 », « Exon 20 Codon 790 » ou « Exon 21 Codons 858 to 961 » (exon 21 codons 858 à 961) à partir de « Reports » (rapports) dans le menu (figure 5).

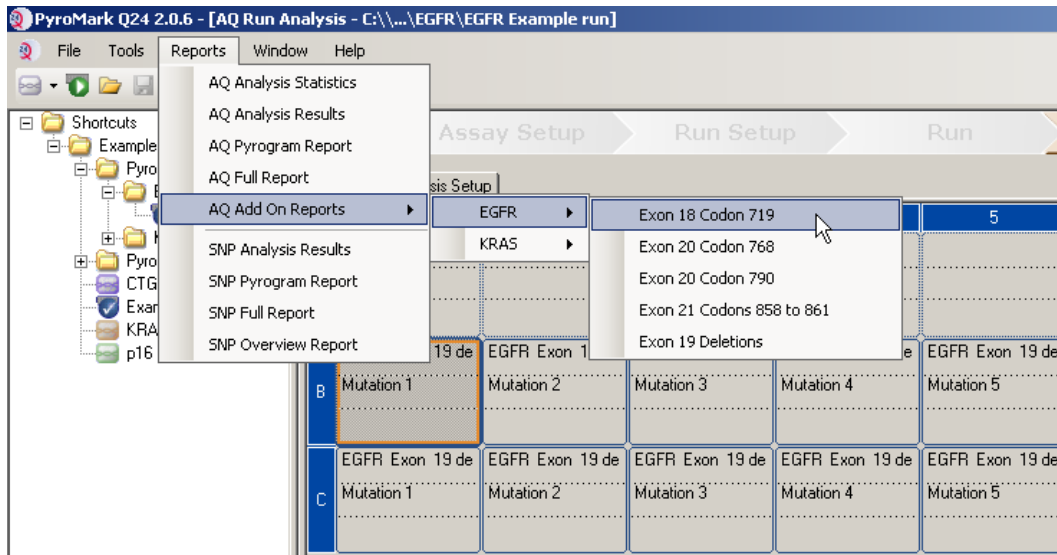


Figure 5. Figure 5. Écran AQ Run Analysis (Analyse de quantification des allèles).

Les puits seront automatiquement analysés afin de détecter toutes les mutations pour lesquelles la LoD est fournie dans le tableau 8. Les résultats seront présentés dans un tableau récapitulatif (figure 6), suivi des résultats détaillés, qui incluent les pyrogrammes et la qualité de l'analyse.

Summary

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Amino Acid Substitution	Info
A1	B104683	Mutation	34.0	del E746-A750	
A2	B105072	Wildtype			
A3	B116390	Mutation	26.6	delL747-P753insS	
A4	B116389	Wildtype			
A5	B116301	Potential low level mutation	3.2	delK745-E749	⚠
A6	B116392	Mutation	15.4	del E746-A750	
A7	WT control	Wildtype			
A8	NTC	Failed Analysis			⚠

⚠ See detailed results for further explanation.

NOTE: For further information about data evaluation please refer to the handbook.

Figure 6. Figure 6. Tableau récapitulatif des résultats.

6. Utilisation de l'analyse de quantification des allèles :

Pour analyser le test EGFR et obtenir un aperçu des résultats, cliquez sur l'un des boutons « Analyze ».



Analyser tous les puits.



Analyser le puits sélectionné.

Les résultats de l'analyse (fréquences des allèles) et l'évaluation de la qualité sont affichés au-dessus de la position de la variable sur le tracé de Pyrogram®. Pour plus d'informations concernant la façon d'analyser un test, voir le Manuel d'utilisation du PyroMark Q24.

Pour générer un rapport, sélectionnez « AQ Full Report » (rapport complet de quantification des allèles) ou « AQ Analysis Results » (résultats de l'analyse de quantification des allèles) dans le menu « Reports » (rapports).

Remarque : La « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) standard telle que définie dans la configuration d'analyse concerne les mutations les plus fréquentes des codons 719, 768, 790, 858 et 861 ainsi que la délétion la plus fréquente de l'exon 19 (voir Annexe A, page 60). Si un échantillon contient une mutation moins fréquente, la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) peut être modifiée pour analyser également le statut mutationnel à cette position, tel que décrit dans l'Annexe A.

Les fréquences de mutations mises à jour dans le gène EGFR humain sont fournies en ligne par le Sanger Institute sur le site www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Remarque : pour garantir la fiabilité des résultats, nous recommandons des hauteurs de pic mononucléotidique supérieures à 20 RLU pour l'analyse du codon 768 et supérieures à 30 RLU pour les quatre autres analyses. Réglez le paramètre « required peak height for passed quality » (hauteur de pic requise pour la validation de la qualité) respectivement sur 20 ou 30 RLU dans la configuration du test (voir le Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 et l'Annexe A).

Remarque : Pour permettre une quantification correcte du codon 719 et du codon 790, ajustez les hauteurs des barres d'histogramme dans la configuration du test (voir Annexe A, page 60).

Remarque : le rapport « AQ Analysis Results » (résultats de l'analyse de quantification des allèles) doit être utilisé pour documenter et interpréter la quantification des allèles. Les nombres apparaissant dans le pyrogramme sont arrondis et ne représentent pas la quantification exacte.

Remarque : le tracé de pyrogramme doit systématiquement être comparé à l'histogramme, que vous pouvez afficher en faisant un clic droit dans la fenêtre Pyrogram (pyrogramme). Les pics mesurés doivent avoir la même hauteur que les barres d'histogramme.

Réanalyse des échantillons sans mutations détectées avec la fonction standard « Sequence to Analyze » (séquence à analyser), ainsi que les échantillons dont l'évaluation de la qualité a été marquée d'un « Check » (à vérifier) ou d'un « Failed » (échec).

Nous recommandons fortement de réanalyser tous les échantillons sans mutations détectées avec la fonction standard « Sequence to Analyze » (séquence à analyser), ainsi que les échantillons dont l'évaluation de la qualité a été marquée d'un « Check » (à vérifier) ou d'un « Failed » (échec). Les évaluations de qualité « Check » (à vérifier) et « Failed » (échec) peuvent

indiquer une mutation au niveau d'une autre position, donnant lieu à de valeurs maximales de référence inattendues.

Pour réanalyser et cibler les mutations moins fréquentes, accédez à « Analysis Setup » (configuration d'analyse) et modifiez « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) avec les variantes décrites à l'Annexe A ou les variantes d'autres mutations rares ou inattendues. Cliquez sur « Apply » (appliquer), puis sur « To All » (à tous) lorsque la fenêtre « Apply Analysis setup » (appliquer la configuration de l'analyse) apparaît.

Remarque : après avoir modifié la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser), assurez-vous que le seuil pour la hauteur de pic mononucléotidique ainsi que la hauteur des barres d'histogramme sont ajustés de manière conforme (voir Annexe A, page 60).

Remarque : si les pics mesurés ne concordent pas avec la hauteur des barres d'histogramme et qu'une mutation rare ou inattendue ne permet pas d'expliquer ce phénomène, le résultat ne doit pas être utilisé pour déterminer le statut mutationnel. Il est recommandé de réanalyser l'échantillon.

Interprétation des résultats

Interprétation des résultats d'analyse et détection des mutations de faible niveau

Il est fortement recommandé d'inclure un ADN de contrôle non méthylé dans chaque analyse à des fins de comparaison et en tant que témoin pour le bruit de fond. La fréquence mesurée pour l'échantillon témoin doit être inférieure ou égale à la limite du blanc (LoB).

Tous les échantillons doivent être examinés par rapport à la limite de détection (LoD, voir le tableau 8) et interprétés comme suit.

- Fréquence de mutation $<$ LoD : Type sauvage
- Fréquence de mutation \geq LoD et \leq LoD + 3 unités % : mutation de faible niveau potentielle

Remarque : si vous utilisez le Plug-In Report (voir l'étape 5 de la section « Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24 », page 33), un avertissement sera diffusé si cela se produit.

Les échantillons pour lesquels une mutation de faible niveau potentielle a été rapportée ne doivent être considérés positifs pour cette mutation que si ce résultat est confirmé lors d'une nouvelle analyse en duplicat avec un échantillon contenant de l'ADN de contrôle non méthylé. Le résultat des deux duplicats doit être \geq LoD et différent du résultat de l'échantillon témoin. Dans le cas contraire, l'échantillon doit être considéré comme de type sauvage.

- Fréquence de mutation $>$ LoD + 3 unités % : mutation

Si vous utilisez l'EGFR Plug-In Report, cela sera effectué automatiquement.

Remarque : il est recommandé d'utiliser l'EGFR Plug-In Report pour l'interprétation des résultats. Pour un examen plus approfondi des échantillons pour lesquels une mutation de faible niveau potentielle est rapportée, nous recommandons d'analyser également l'échantillon manuellement dans le logiciel de l'application (p. ex., pour comparaison avec la fréquence mutationnelle de l'échantillon témoin).

Remarque : une fréquence mesurée supérieure à la LoB dans l'échantillon témoin indique un bruit de fond supérieur à la normale lors de l'analyse concernée, susceptible d'influer sur la quantification des allèles, en particulier pour les faibles niveaux mutationnels. Dans ce cas, les fréquences mesurées incluses dans l'intervalle entre la LoD (tableau 8) et la LoD + 3 unités % ne doivent pas servir de base à l'estimation du statut mutationnel. Il est recommandé de réanalyser les échantillons contenant une mutation de niveau faible potentielle.

Remarque : une décision relative au traitement des patients atteints de cancer ne doit pas s'appuyer uniquement sur le statut mutationnel du gène EGFR.

Tableau 8. LoB et LoD déterminées pour des mutations spécifiques

Mutation	Substitution d'un acide aminé	LoB (unités %)	LoD (unités %)	ID COSMIC* (V47)
Délétions au niveau de l'exon 19				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATTC	E746_A750>IP	0,8	1,6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1,1	2,8	13551
2235del15 [†]	E746_A750del	0,9	1,8	6223
2236del15 [†]	E746_A750del	0,2	1,2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0,8	2,4	12386
2237_2255>T [†]	E746_S752>V	0,6	1,6	12384
2237del15 [†]	E746_T751>A	0,9	1,9	12678
2237del18	E746_S752>A	0,5	1,7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0,8	2,5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0,2	0,6	12419
2238del18	E746_S752>D	0,3	1,1	6220
2239_2248>C [†]	L747_A750>P	1,8	2,5	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0,6	1,7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1,3	3,9	12387
2239del18 [†]	L747_S752del	0,6	1,5	6255
2239del9	L747_E749del	2,0	3,7	6218
2240del12	L747_T751>S	0,4	1,5	6210
2240del15	L747_T751del	0,9	1,9	12369
2240del18 [†]	L747_P753>S	0,9	1,9	12370

* Catalogue des mutations somatiques associées au cancer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), disponible en ligne sur le site du Sanger Institute à l'adresse www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] La LoD de certaines délétions rares au niveau de l'exon 19 a été déterminée en ajoutant six écarts types de mesures de blanc à la valeur de LoB.

Suite du tableau sur la page suivante

Tableau 8. Suite

Mutation	Substitution d'un acide aminé	LoB (unités %)	LoD (unités %)	ID COSMIC* (V47)
Exon 18 codon 719 (GGC)				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
Exon 20 codon 768 (AGC)				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
Exon 20 codon 790 (ACG)				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
Exon 21 codon 858 (CTG)				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) [†]	6224
Exon 21 codon 861 (CTG)				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

* Catalogue des mutations somatiques associées au cancer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), disponible en ligne sur le site du Sanger Institute à l'adresse www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Niveau de mutation le plus bas pour un échantillon donnant lieu à une fréquence mesurée \geq LoD.

Résultats représentatifs

Les résultats représentatifs de Pyrogram sont présentés dans les figures 7 à 14.

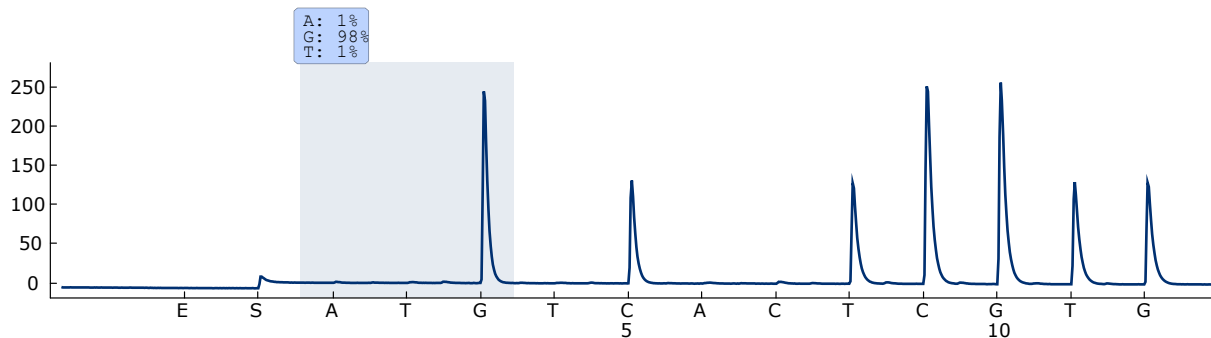


Figure 7. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotype sauvage au niveau du codon 719 avec la fonction « Sequence to analyze » (séquence à analyser) DGCTCCGGTGC.

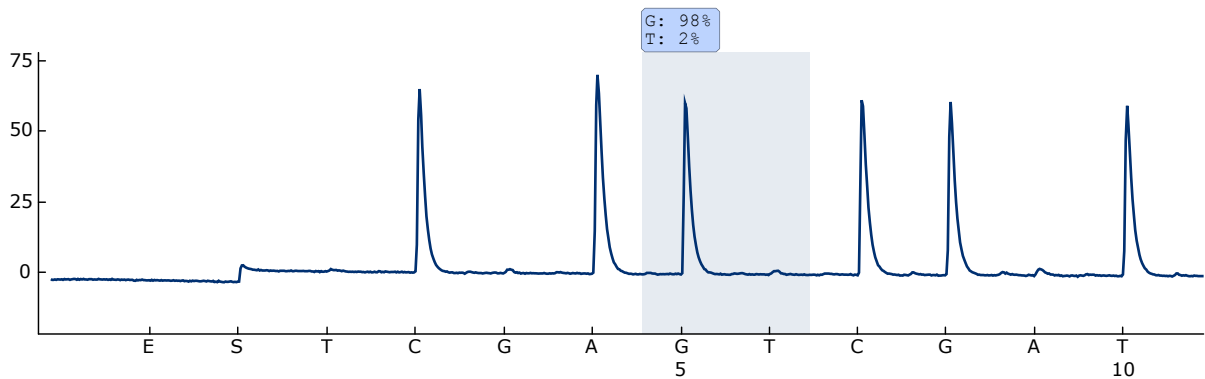


Figure 8. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotype sauvage au niveau du codon 768 avec la fonction « Sequence to analyze » (séquence à analyser) CAKCGTG.

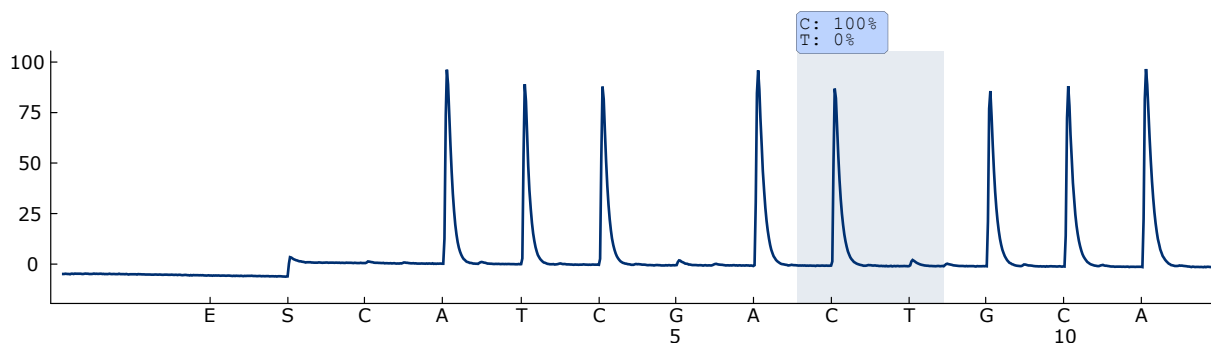


Figure 9. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotype sauvage au niveau du codon 790 avec la fonction « Sequence to analyze » (séquence à analyser) ATCAYGCAG.

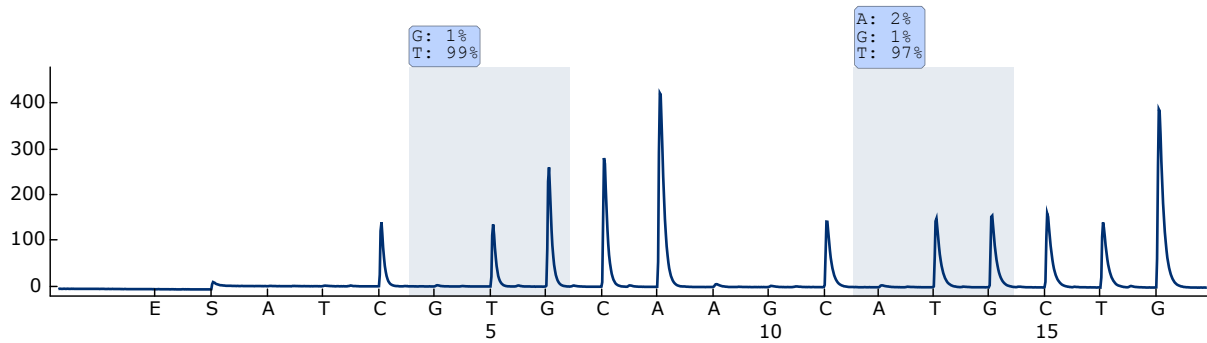


Figure 10. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotype sauvage au niveau des codons 858–861 avec la fonction « Sequence to analyze » (séquence à analyser) C KGGCCAAACDGCTGGGT.

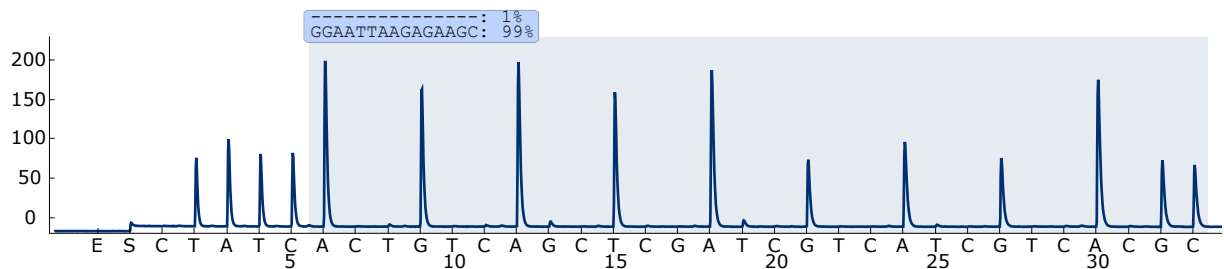


Figure 11. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotype sauvage au niveau de l'exon 19.

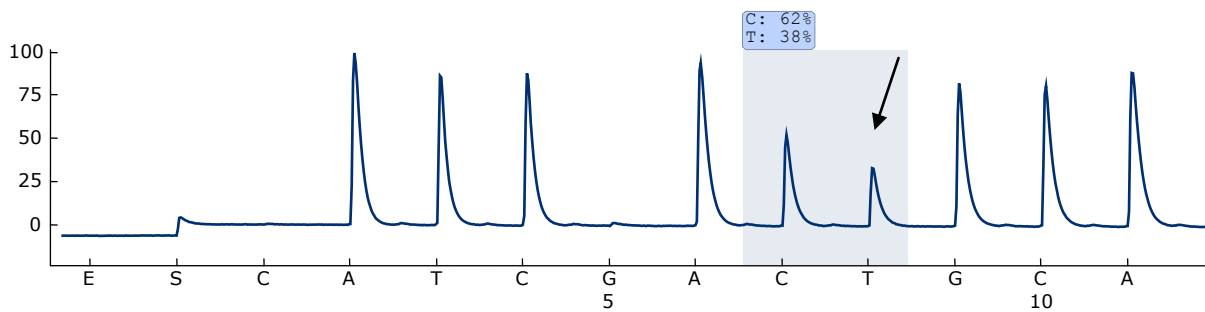


Figure 12. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant une mutation ACG → ATG au niveau de la base 2 du codon 790 (indiquée par une flèche).

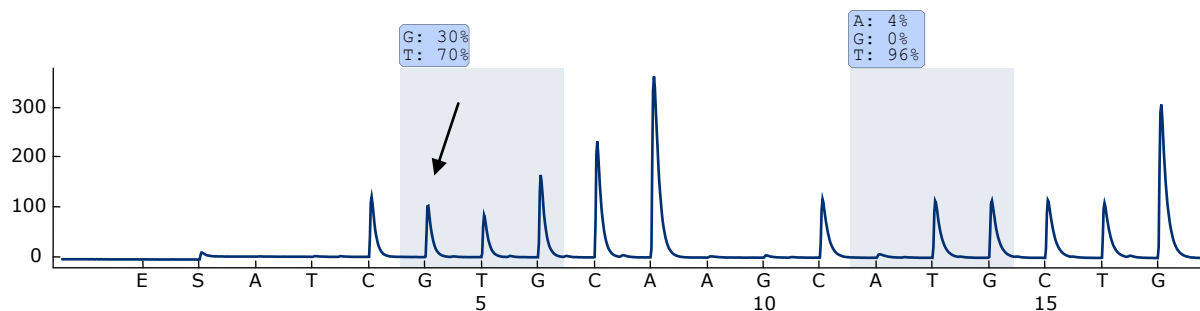


Figure 13. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant une mutation CTG → CGG au niveau de la base 2 du codon 858 (indiquée par une flèche).

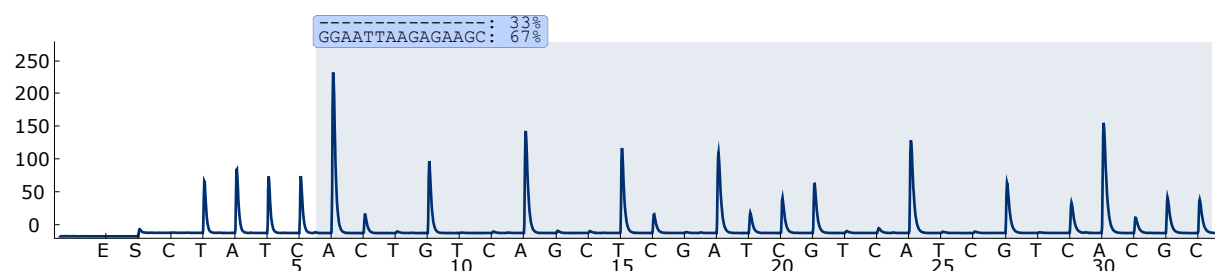


Figure 14. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant une délétion 2235del15 au niveau de l'exon 19.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour de plus amples informations, consulter également la page de foire aux questions dans notre Centre de support technique à l'adresse suivante : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques du support technique de QIAGEN sont toujours heureux de répondre aux questions concernant les informations et les protocoles contenus dans ce manuel ou à propos des technologies d'échantillonnage et de dosage (pour les coordonnées, voir le quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com).

Remarque : Veuillez vous référer au *PyroMark Q24 User Manual* (Manuel d'utilisation du PyroMark Q24) pour des informations générales concernant le dépannage de l'instrument.

Commentaires et suggestions

Signaux du témoin négatif

- | | |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Interférence entre les puits | Le signal d'un puits est détecté par un puits voisin. Évitez de placer des échantillons présentant des intensités de signal élevées près de puits de témoin négatif. |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Commentaires et suggestions

- b) Contamination PCR Utilisez des pointes de pipette stériles avec filtres. Stockez et extrayez les substances telles que les prélèvements, les témoins et les amplicons séparément des réactifs de PCR.

Séquence pauvre ou inattendue

- a) ADN génomique de mauvaise qualité L'ADN génomique de mauvaise qualité peut provoquer un échec de la PCR. Analysez les échantillons de PCR à l'aide d'une technique électrophorétique (par exemple, le système QIAxcel[®] ou l'électrophorèse sur gel d'agarose).

Résultat « Check » (à vérifier) ou « Failed » (échec)

- a) Faible hauteur de pic Des erreurs de manipulation lors de la configuration de la PCR ou de la préparation des échantillons avant le pyroséquençage peuvent entraîner de faibles pics. Testez régulièrement le fonctionnement des sondes à filtre, tel que décrit dans le Manuel d'utilisation du PyroMark Q24, et remplacez-les aux échéances indiquées.
- En cas d'avertissement marqué d'un « Check » (à vérifier), comparez attentivement le tracé de pyrogramme et l'histogramme, que vous pouvez afficher en faisant un clic droit dans la fenêtre Pyrogram (pyrogramme). Si les pics mesurés concordent avec la hauteur des barres d'histogramme, le résultat est valide. Dans le cas contraire, il est recommandé de réanalyser l'échantillon.
- b) Mutation non définie dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) Ajustez la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) dans la configuration du test (voir Annexe A, page 60) et effectuez une réanalyse.

Commentaires et suggestions

- c) Mutation inattendue rare
- Une évaluation de la qualité marquée d'un « Check » (à vérifier) ou d'un « Failed » (échec) peut être provoquée par un modèle de pics inattendu. Cela peut indiquer une mutation inattendue qui n'est pas analysée par la fonction « Sequences to Analyze » (séquences à analyser) fournie. Ces échantillons doivent être analysés à l'aide de la fonction « Sequences to Analyze » (séquences à analyser) alternative en raison des mutations inattendues.
- d) Avertissement relatif à une déviation de la hauteur de pic maximal au niveau de la distribution x
- Le tracé de pyrogramme doit être comparé attentivement à l'histogramme, que vous pouvez afficher en faisant un clic droit dans la fenêtre Pyrogram (pyrogramme). Si les pics mesurés ne concordent pas avec la hauteur des barres d'histogramme et qu'une mutation rare ne permet pas d'expliquer ce phénomène, il est recommandé de réanalyser l'échantillon.
- d) Le message d'avertissement « Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 8 » (incertitude/échec en raison d'une déviation de la hauteur de pic maximal au niveau de la distribution 8) apparaît dans l'analyse du codon 790.
- Le bruit de fond au niveau de la distribution T8 est en dessous du niveau attendu. Ajustez la hauteur de la barre d'histogramme à la valeur par défaut (1,00) (possible uniquement avec l'outil d'analyse intégré au logiciel PyroMark Q24).

Commentaires et suggestions

- e) Le message d'avertissement « Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 10 » (incertitude/échec en raison d'une déviation de la hauteur de pic maximal au niveau de la distribution 10) apparaît dans l'analyse des codons 858-861.
- Une mutation CTG > CGG de haut niveau au niveau du codon 858 (L858R) peut entraîner une augmentation du bruit de fond dans les distributions G-10 et A-12 ainsi qu'une fréquence supérieure à la LoD pour la mutation ATG > CAG au niveau du codon 861 (L861Q). Dans ce cas, seule la mutation L585R rapportée est valide, et l'avertissement et l'évaluation de qualité « Check » (à vérifier) peuvent être ignorés.
- Remarque :** l'EGFR Plug-in Report ne signalera qu'une seule mutation (c'est-à-dire celle dont la fréquence est la plus élevée).
- f) Le message d'avertissement « Uncertain due to high peak height deviation at dispensation: 23 » (incertitude en raison d'une déviation de la hauteur de pic maximal au niveau de la distribution 23) apparaît lorsque la délétion 2235del15 est rapportée.
- Une délétion 2235del15 de haut niveau peut entraîner l'apparition de cet avertissement. Dans ce cas, la mutation rapportée est valide, et l'avertissement et l'évaluation de qualité « Check » (à vérifier) peuvent être ignorés.

Commentaires et suggestions

Bruit de fond élevé

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Stockage des nucléotides incorrect | Stockez les nucléotides entre 2 et 8 °C. Le stockage entre –15 et –25 °C peut provoquer une augmentation du bruit de fond. |
| b) Temps de refroidissement des échantillons trop court avant l'analyse de pyroséquençage | Laissez les échantillons sur un portoir de plaque PyroMark Q24 à température ambiante pendant 10 à 15 minutes. Ne raccourcissez pas le temps de refroidissement. |
| c) Contamination de la cartouche | Nettoyez soigneusement la cartouche, tel que décrit dans la fiche produit. Conservez la cartouche à l'abri de la lumière et de la poussière. |

Aucun signal pour le témoin positif (ADN de contrôle non méthylé)

- | | |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Mélange d'enzymes ou de substrats insuffisant pour tous les puits | Assurez-vous de bien remplir la cartouche PyroMark Q24 conformément aux « Pre Run Information » (informations de pré-analyse) du menu « Tools » (outils). |
| b) Réactifs stockés ou dilués de manière incorrecte | Préparez les réactifs <i>therascreen</i> conformément aux instructions fournies à la section « Protocole 5 : Mettez sous tension le PyroMark Q24 », page 30. |
| c) Échec de la PCR ou de la préparation de l'échantillon | Des erreurs de manipulation lors de la configuration de la PCR, de la programmation de l'instrument de PCR ou de la préparation des échantillons avant le pyroséquençage peuvent entraîner une absence de signal. Testez le fonctionnement des sondes à filtre, tel que décrit dans le Manuel d'utilisation du PyroMark Q24, et remplacez-les si nécessaire. Recommencez la PCR et l'analyse de pyroséquençage. |

Contrôle qualité

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

Limitations

Tous les résultats de diagnostic générés doivent être interprétés en tenant compte d'autres résultats cliniques ou de laboratoire.

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

Caractéristiques des performances

Limite du blanc et limite de détection

La limite du blanc (LoB) et la limite de détection (LoD) ont été déterminées pour un certain nombre de mutations à l'aide de mélanges de plasmides (tableau 9). LoB et LoD ont été déterminées conformément aux recommandations du protocole EP17-A du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) « Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline ». Les erreurs α et β (respectivement faux positif et faux négatif) ont été définies à 5 %. La LoD de certaines délétions rares au niveau de l'exon 19 a été déterminée en ajoutant six écarts types de mesures de blanc à la valeur de LoB.

Les valeurs de la LoB représentent la fréquence mesurée obtenue avec un échantillon de type sauvage. Les valeurs de la LoD représentent le signal le plus bas (fréquence mesurée) qui peut être considéré comme un positif pour la mutation correspondante.

Mutation CTG → CGG au niveau du codon 858

Pour la mutation CTG → CGG au niveau du codon 858, les mesures d'échantillons avec des niveaux faibles de mutation ont donné lieu à une distribution non gaussienne. La LoD a donc été déterminée à l'aide d'une méthode différente, conformément aux recommandations du protocole EP17A du CLSI. Le signal le plus faible indiquant la présence d'une mutation (LoD) à ces positions a été défini sur 2 unités % au-dessus du niveau de ligne de base respective définie par le 95ème centile des mesures de blanc. Lors de l'analyse d'un échantillon avec un niveau de mutation de 5,5 %, 95 % des résultats ($n = 72$) ont donné un signal qui peut être considéré comme positif (\geq LoD, à savoir $\geq 2,6$ % unités).

Tableau 9. LoB et LoD déterminées pour des mutations spécifiques

Mutation	Substitution d'un acide aminé	LoB (unités %)	LoD (unités %)	ID COSMIC* (V47)
Délétions au niveau de l'exon 19				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATC	E746_A750>IP	0,8	1,6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1,1	2,8	13551
2235del15 [†]	E746_A750del	0,9	1,8	6223
2236del15 [†]	E746_A750del	0,2	1,2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0,8	2,4	12386
2237_2255>T [†]	E746_S752>V	0,6	1,6	12384
2237del15 [†]	E746_T751>A	0,9	1,9	12678
2237del18	E746_S752>A	0,5	1,7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0,8	2,5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0,2	0,6	12419
2238del18	E746_S752>D	0,3	1,1	6220
2239_2248>C [†]	L747_A750>P	1,8	2,5	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0,6	1,7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1,3	3,9	12387
2239del18 [†]	L747_S752del	0,6	1,5	6255
2239del9	L747_E749del	2,0	3,7	6218
2240del12	L747_T751>S	0,4	1,5	6210
2240del15	L747_T751del	0,9	1,9	12369
2240del18 [†]	L747_P753>S	0,9	1,9	12370

* Catalogue des mutations somatiques associées au cancer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), disponible en ligne sur le site du Sanger Institute à l'adresse www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] La LoD de certaines délétions rares au niveau de l'exon 19 a été déterminée en ajoutant six écarts types de mesures de blanc à la valeur de LoB.

Tableau 9. Suite

Mutation	Substitution d'un acide aminé	LoB (unités %)	LoD (unités %)	ID COSMIC* (V47)
Exon 18 codon 719 (GGC)				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
Exon 20 codon 768 (AGC)				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
Exon 20 codon 790 (ACG)				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
Exon 21 codon 858 (CTG)				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) [†]	6224
Exon 21 codon 861 (CTG)				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

* Catalogue des mutations somatiques associées au cancer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), disponible en ligne sur le site du Sanger Institute à l'adresse www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

[†] Niveau de mutation le plus bas pour un échantillon donnant lieu à une fréquence mesurée \geq LoD.

Remarque : ces valeurs étaient basées sur des analyses où des mélanges de plasmides porteurs du type sauvage ou de la séquence mutée respective avaient été utilisés comme matrice pour l'amplification PCR.

Remarque : Il est recommandé que le laboratoire confirme la méthode à utiliser.

Linéarité

La linéarité a été déterminée à l'aide de mélanges de plasmides porteurs de la séquence sauvage ou mutante pour les mutations GGC > AGC au niveau du codon 719, ACG > ATG au niveau du codon 790 et CTG > CGG au niveau du codon 858 et pour les délétions 2235del15 et 2236del15 au niveau de l'exon 19. Les plasmides ont été mélangés dans des proportions permettant d'obtenir quatre niveaux de mutation (5, 10, 30 et 50 %). Chaque mélange a été analysé avec trois lots différents du kit *therascreen* EGFR Pyro, lors de trois analyses de pyroséquençage portant chacune sur trois réplicats.

Les résultats ($n = 9$ pour chaque niveau de mutation) ont été analysés conformément au protocole EP6-A du CLSI « Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline », avec le logiciel Analyse-it® v2.21. Ces résultats sont illustrés dans la figure 15 pour la délétion 2235del15 au niveau de l'exon 19.

Les résultats étaient linéaires, avec une non-linéarité autorisée de 5 unités % dans l'intervalle testé de 5 à 50 % de niveau de mutation. Des résultats similaires ont été obtenus pour les mutations GGC > AGC au niveau du codon 719, ACG > ATG au niveau du codon 790 et CTG > CGG au niveau du codon 858 et pour la délétion 2236del15 au niveau de l'exon 19.

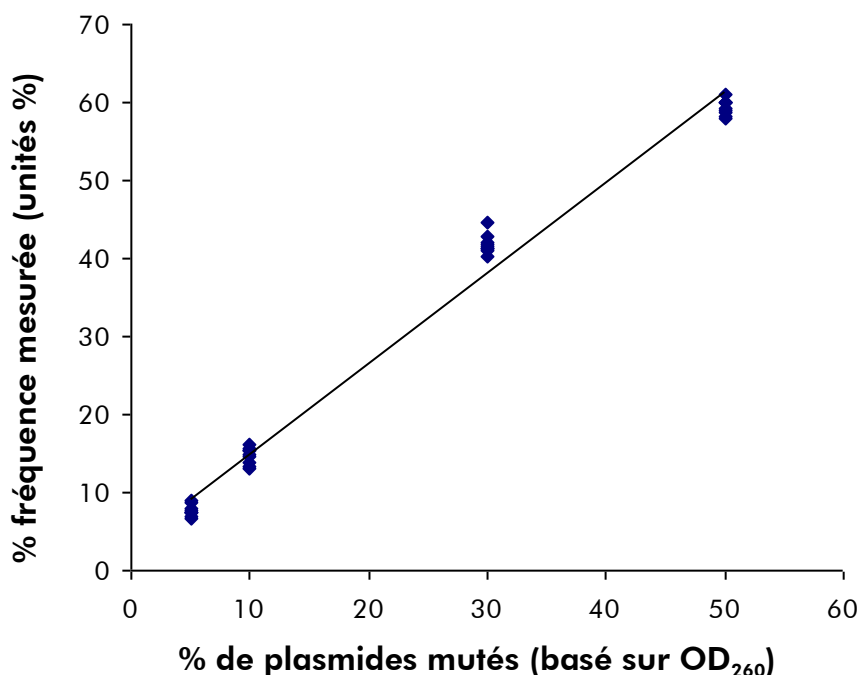


Figure 15. Linéarité de la délétion 2235del15 au niveau de l'exon 19.

Précision

Les données de précision permettent de déterminer la variabilité totale des tests. Elles ont été obtenues pour trois niveaux différents, par analyse des mélanges de plasmides susmentionnés, avec trois réplicats chacune.

La répétabilité (variabilité intratest et interlot) a été calculée sur la base des données utilisées pour déterminer la linéarité (trois analyses réalisées le même jour avec divers lots du kit *therascreen* EGFR Pyro). La précision moyenne (variabilité intralaboratoire) a été déterminée lors de trois analyses réalisées dans un seul laboratoire, trois jours différents, par des opérateurs, sur des systèmes PyroMark Q24 et avec des lots du kit *therascreen* EGFR Pyro variables. La reproductibilité (variabilité interlaboratoire) a été calculée à partir de deux analyses réalisées chacune dans un laboratoire interne et dans un laboratoire externe, avec divers lots du kit *therascreen* EGFR Pyro.

Les estimations de la précision sont exprimées en tant qu'écart type des fréquences de mutation mesurées, en unités % (tableau 10). La répétabilité, la précision moyenne et la reproductibilité de la délétion 2235del15 au niveau de l'exon 19 étaient respectivement de 0,8–1,2, 0,7–2,9 et 0,7–1,8 unités %, dans les limites mesurées d'un niveau de mutation compris entre 5 et 50 %. Des résultats similaires ont été obtenus pour les mutations GGC > AGC au niveau du codon 719, ACG > ATG au niveau du codon 790 et CTG > CGG au niveau du codon 858 et pour la délétion 2236del15 au niveau de l'exon 19.

Tableau 10. Précision pour la délétion 2235del15 au niveau de l'exon 19*

% de plasmides mutés [†]	Répétabilité		Précision moyenne		Reproductibilité	
	Moy.	σ	Moy.	σ	Moy.	σ
5	7,7	0,8	7,4	0,7	7,4	0,7
10	14,7	1,1	14,5	1,3	14,4	1,1
30	41,8	1,2	40,0	2,0	41,5	1,7
50	59,4	1,0	58,2	2,9	60,7	1,8

* Toutes les valeurs sont exprimées en unités %. σ : écart type (n = 9).

[†] Basé sur la mesure OD₂₆₀.

Évaluation diagnostique

Le kit *therascreen* EGFR Pyro a été évalué par comparaison avec le séquençage Sanger et le kit *therascreen* EGFR RGQ. L'ADN a été extrait de 100 échantillons de tumeurs fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE) issus d'un cancer

du poumon non à petites cellules (CPNPC) et analysé pour détecter les mutations au niveau des codons 719, 768, 790 et 858–861 et les délétions et mutations complexes au niveau de l'exon 19.

L'ADN a été isolé à l'aide du kit QIAamp DNA FFPE Tissue. Les analyses ont été réalisées avec le kit *therascreen* EGFR Pyro sur le PyroMark Q24 et avec le kit *therascreen* EGFR RGQ sur le Rotor Gene-Q 5plex HRM series II. Le séquençage Sanger a été réalisé sur l'ABI® 3130 Genetic Analyzer.

Sur les 100 échantillons analysés, le statut mutationnel a pu être déterminé pour tous les codons et pour l'exon 19 dans 97 échantillons, avec les trois méthodes. Pour deux échantillons, le statut mutationnel du codon 768 n'a pas pu être déterminé par pyroséquençage. L'analyse d'un échantillon a échoué pour la plupart des codons avec les trois méthodes, ce qui indique une qualité d'ADN trop faible pour l'amplification.

La mutation de résistance T790M a été détectée dans un échantillon avec les trois méthodes, alors que la mutation L861Q a été détectée dans un échantillon uniquement par pyroséquençage. Treize, 20 et 16 délétions et mutations complexes au niveau de l'exon 19 ont été détectées par pyroséquençage, analyse Rotor-Gene Q et séquençage Sanger, respectivement. Trois des délétions au niveau de l'exon 19 détectées par séquençage Sanger n'ont pu être reproduites ni par pyroséquençage ni par analyse Rotor-Gene Q. La mutation L858R a été détectée dans trois échantillons par les trois méthodes, dans deux échantillons par pyroséquençage et l'une des deux autres méthodes, dans un échantillon par pyroséquençage uniquement et dans un échantillon par analyse Rotor-Gene Q uniquement. Les résultats sont illustrés dans les tableaux 11–14.

Aucune mutation n'a été détectée au niveau des codons 719 et 768 dans les 100 échantillons, quelle que soit la méthode employée.

Si l'on exclut les échantillons dont l'analyse par une ou plusieurs méthodes a échoué, le kit *therascreen* EGFR Pyro et le séquençage Sanger ont donné une concordance de 100 %, 98 %, 99 % et 97 % concernant les résultats pour les codons 790, 858, 861 et l'exon 19, respectivement. Le kit *therascreen* EGFR Pyro et le kit *therascreen* EGFR RGQ ont montré une concordance de 100 %, 97 %, 99 % et 99 % concernant les résultats obtenus pour les codons 790, 858, 861 et pour l'exon 19, respectivement (tableaux 11–14).

Tableau 11. Résultats des échantillons de tumeurs cutanées analysés pour le codon 790

		Séquençage Sanger			
		Mutant	Type sauvage	Inconnu	Total
Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	1	0	1	2
	Type sauvage	0	98	0	98
	Inconnu	0	0	0	0
	Total	1	98	1	100
		Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ			
		Mutant	Type sauvage	Inconnu	Total
Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	1	0	1	2
	Type sauvage	0	98	0	98
	Inconnu	0	0	0	0
	Total	1	98	1	100

Tableau12. Résultats des échantillons de tumeurs de CPNPC analysés pour le codon 858

		Séquençage Sanger			
		Mutant	Type sauvage	Inconnu	Total
Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	4	2	0	6
	Type sauvage	0	93	0	93
	Inconnu	0	0	1	1
	Total	4	95	1	100
		Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ			
		Mutant	Type sauvage	Inconnu	Total
Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	4	2	0	6
	Type sauvage	1	92	0	93
	Inconnu	0	1	0	1
	Total	5	95	0	100

Tableau 13. Résultats des échantillons de tumeurs de CPNPC analysés pour le codon 861

		Séquençage Sanger			
		Mutant	Type sauvage	Inconnu	Total
Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	0	1	0	1
	Type sauvage	0	98	0	98
	Inconnu	0	1	0	1
	Total	0	100	0	100
		Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ			
		Mutant	Type sauvage	Inconnu	Total
Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	0	1	0	1
	Type sauvage	0	98	0	98
	Inconnu	0	0	1	1
	Total	0	99	1	100

Tableau 14. Résultats des échantillons de tumeurs de CPNPC analysés pour l'exon 19

		Séquençage Sanger			
		Mutant	Type sauvage	Inconnu	Total
Kit therascreen EGFR Pyro	Mutant	13	0	0	13
	Type sauvage	3	84	0	87
	Inconnu	0	0	0	0
	Total	16	84	0	100
		Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ			
		Mutant	Type sauvage	Inconnu	Total
Kit therascreen EGFR Pyro	Mutant	12	1	0	13
	Type sauvage	0	86	1	87
	Inconnu	0	0	0	0
	Total	12	87	1	100

Remarque : lors de toutes les analyses utilisées pour obtenir des informations sur les performances, le signal était supérieur à 20 RLU pour l'analyse du codon 768 et supérieur à 30 RLU pour les quatre autres analyses, comme cela est systématiquement le cas pour l'analyse de 10 ng d'ADN isolé de tissus fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE). Les données de pyroséquençage ont été analysées à l'aide de l'EGFR Plug-in Report.






Références

QIAGEN tient à jour une grande base de données en ligne de publications scientifiques utilisant les produits QIAGEN. Des critères de sélection de recherche vous aident à trouver les articles dont vous avez besoin à l'aide d'un simple mot-clé ou en spécifiant l'application, le domaine de recherche, le titre, etc.

Pour une liste complète des références, visitez notre base de données en ligne « QIAGEN Reference Database » à l'adresse

www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou bien contactez les services techniques de QIAGEN ou votre distributeur local.

Symboles

 Σ	<N> Contient des réactifs pour <N> tests
	À utiliser avant
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro
REF	Numéro de référence
LOT	Numéro de lot
MAT	Numéro de la substance
COMP	Composants
CONT	Contient
NUM	Nombre
NaOH	Hydroxyde de sodium
GTIN	Code article international (GTIN)
	Limite de température
	Fabricant
	Consultez les instructions d'utilisation

Coordonnées

Pour obtenir une assistance technique et plus d'informations, veuillez consulter notre Centre du support technique à l'adresse www.qiagen.com/Support ou appeler l'un des services techniques de QIAGEN ou l'un des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Annexe A : Préparation des tests *therascreen* EGFR Pyro

Si l'EGFR Plug-in Report a été installé, des configurations de test prédéfinies pour les codons 719, 768, 790 et 858–861 et pour les délétions au niveau de l'exon 19 sont disponibles dans le raccourci du navigateur du logiciel PyroMark Q24, sous « Example Files/PyroMark Setups/EGFR ». Les étapes suivantes n'ont pas besoin d'être effectuées. Vous pouvez obtenir l'EGFR Plug-in Report par e-mail en écrivant à l'adresse [from pyro.plugin@qiagen.com](mailto:from_pyro.plugin@qiagen.com).

Nous recommandons vivement l'utilisation de l'EGFR Plug-In Report plutôt que de l'analyse manuelle. Les mutations complexes ne peuvent pas être ajoutées manuellement à une fonction « Sequence to Analyze ». Elles doivent être analysées à l'aide du plug-in. Après installation du plug-in ou à chaque fois qu'un nouveau logiciel est installé ou mis à niveau sur l'ordinateur, la fonction correcte du plug-in doit être vérifiée, tel que décrit dans le Guide rapide de l'EGFR Plug-In.

Si l'EGFR Plug-In Report n'a pas été installé, le fichier du test doit être configuré manuellement avant la première analyse du test *therascreen* EGFR Pyro. Configurez le test pour les codons d'EGFR 719, 768, 790 et 858–861, ainsi que pour les délétions au niveau de l'exon 19 à l'aide du logiciel PyroMark Q24, tel que décrit ci-dessous.

Procédure

Codon d'EGFR 719

A1. Cliquez sur  dans la barre d'outils puis sélectionnez « New AQ Assay » (nouveau test de quantification des allèles).

A2. Entrez la séquence suivante dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser).

DGCTCCGGTGC

Remarque : Les mutations les plus fréquentes dans le codon 719 seront détectées dans le nucléotide 2155 à l'aide de la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser).

La fonction « Sequence to Analyze » peut être modifiée après l'analyse des mutations au niveau du nucléotide 2156. Pour savoir si des mutations sont présentes dans le nucléotide 2156, remplacez la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») par la séquence suivante :

GSCTCCGGTGC

Remarque : Assurez-vous que le seuil pour la hauteur de pic mononucléotidique est réglé sur 30 RLU. En outre, assurez-vous que les

hauteurs des barres d'histogramme sont ajustées correctement (voir les instructions ci-dessous).

**A3. Saisissez manuellement l'ordre de distribution (« Dispensation Order ») suivant :
ATGCTACTCGTG**

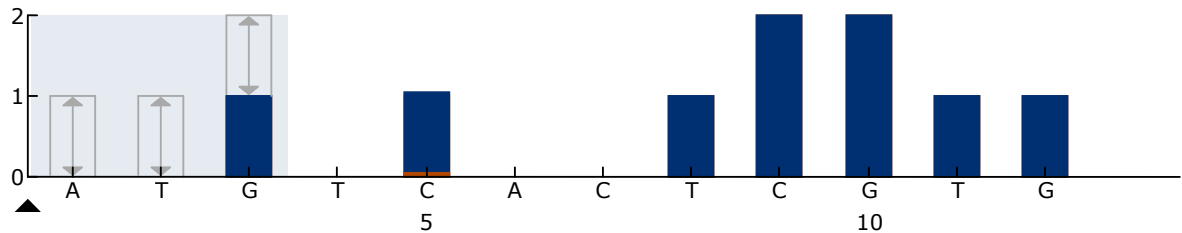


Figure 16. Histogramme du codon 719 (nucléotide 2155) avec la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») DGCTCCGGTGC. Le rectangle rouge à la base de la barre au niveau de la distribution C5 illustre l'ajustement des hauteurs des barres d'histogramme.

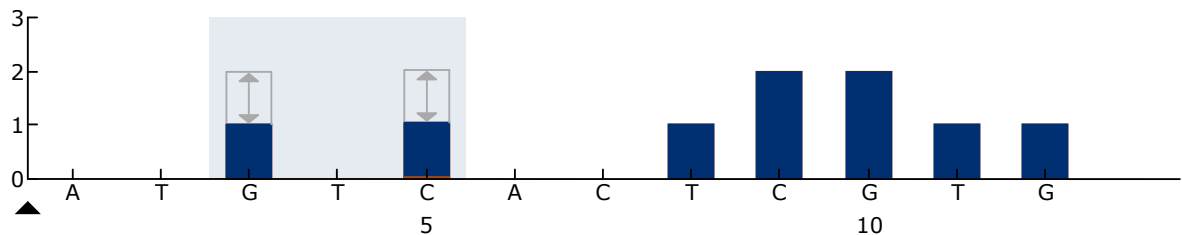


Figure 17. Histogramme du codon 719 (nucléotide 2156) avec la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») GSCTCCGGTGC. Le rectangle rouge à la base de la barre au niveau de la distribution C5 illustre l'ajustement des hauteurs des barres d'histogramme.

- A4. Cliquez sur l'onglet « Analysis Parameters » (paramètres de l'analyse) et augmentez la valeur du champ « Peak Height Threshold - Required peak height for Passed Quality: » (seuil de hauteur de pic - hauteur de pic requise pour la validation de la qualité) jusqu'à 30.**
- A5. Dans l'histogramme, déplacez le curseur de la souris sur l'extrémité supérieure de la barre, au niveau de la distribution C5, et cliquez tout en maintenant la touche « Ctrl » enfoncée. Une petite fenêtre indiquant la hauteur par défaut de la barre d'histogramme (1,00) s'affichera. Augmentez le niveau jusqu'à 1,04 pour la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») DGCTCCGGTGC et jusqu'à 2,04 pour la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») GSCTCCGGTGC.**

A6. Cliquez sur  dans la barre d'outils et sauvegardez le test sous le nom « *EGFR codon 719* »

Codon d'EGFR 768

A1. Cliquez sur  dans la barre d'outils puis sélectionnez « *New AQ Assay* » (nouveau test de quantification des allèles).

A2. Entrez la séquence suivante dans « *Sequence to Analyze* » (séquence à analyser).
CAKCGTG

A3. Ajoutez manuellement l'ordre de distribution (« *Dispensation Order* ») suivant.
TCGAGTCGAT

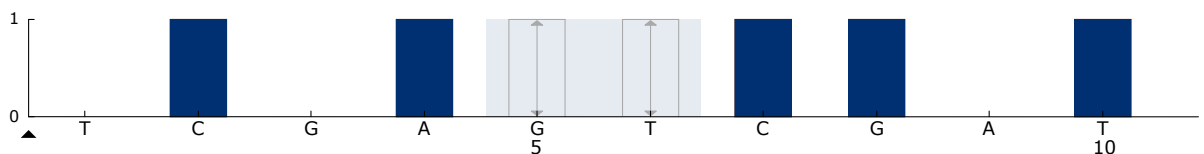


Figure 18. Histogramme du codon 768 (nucléotide 2303) avec la séquence à analyser (« *Sequence to Analyze* ») **CAKCGTG**.

A4. Cliquez sur  dans la barre d'outils et sauvegardez le test sous le nom « *EGFR codon 768* »

Codon d'EGFR 790

A1. Cliquez sur  dans la barre d'outils puis sélectionnez « *New AQ Assay* » (nouveau test de quantification des allèles).

A2. Entrez la séquence suivante dans « *Sequence to Analyze* » (séquence à analyser).
ATCAYGCAG

A3. Ajoutez manuellement l'ordre de distribution (« *Dispensation Order* ») suivant :
CATCGACTGCA

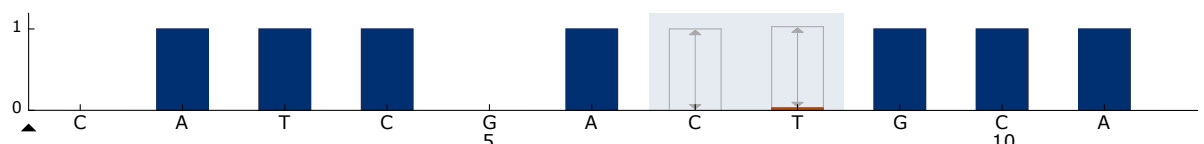




Figure 19. Histogramme du codon 790 (nucléotide 2369) avec la séquence à analyser (« *Sequence to Analyze* ») **ATCAYGCAG**. Le rectangle rouge à la base de la barre au niveau de la distribution T8 illustre l'ajustement des hauteurs des barres d'histogramme.

- A4.** Cliquez sur l'onglet « Analysis Parameters » (paramètres de l'analyse) et augmentez la valeur du champ « Peak Height Threshold - Required peak height for Passed Quality: » (seuil de hauteur de pic - hauteur de pic requise pour la validation de la qualité) jusqu'à 30.
- A5.** Dans l'histogramme, déplacez le curseur de la souris sur l'extrémité supérieure de la barre, au niveau de la distribution T8, et cliquez tout en maintenant la touche « Ctrl » enfoncée. Une petite fenêtre indiquant la hauteur par défaut de la barre d'histogramme (1,00) s'affichera. Augmentez le niveau jusqu'à 1,03.
- A6.** Cliquez sur  dans la barre d'outils et sauvegardez le test sous le nom « EGFR codon 790 »

Codons d'EGFR 858–861

- A1.** Cliquez sur  dans la barre d'outils puis sélectionnez « New AQ Assay » (nouveau test de quantification des allèles).
- A2.** Entrez la séquence suivante dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser).
CKGGCCAAACDGCTGGGT
- A3.** Ajoutez manuellement l'ordre de distribution (« Dispensation Order ») suivant :
ATCGTGCAAGCATGCTG

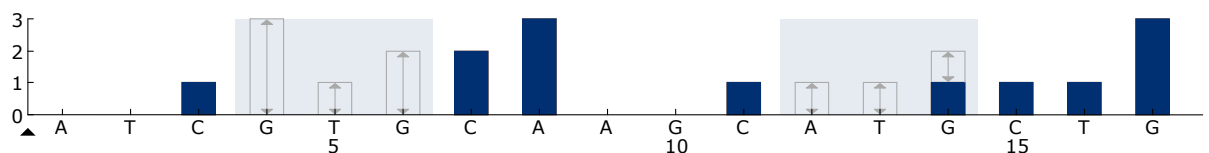




Figure 20. Histogramme des codons 858–861 avec la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») **CKGGCCAAACDGCTGGGT**.

- A4.** Cliquez sur l'onglet « Analysis Parameters » (paramètres de l'analyse) et augmentez la valeur du champ « Peak Height Threshold - Required peak height for Passed Quality: » (seuil de hauteur de pic - hauteur de pic requise pour la validation de la qualité) jusqu'à 30.
- A5.** Cliquez sur  dans la barre d'outils et sauvegardez le test sous le nom « EGFR codons 858-861 ».

Exon d'EGFR 19 del

- A1.** Cliquez sur  dans la barre d'outils puis sélectionnez « New AQ Assay » (nouveau test de quantification des allèles).
- A2.** Entrez la séquence suivante dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser).

TATCAA[GGAATTAAGAGAAGC]AACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA

La délétion la plus fréquente dans l'exon 19 est 2235del15. Pour analyser d'autres délétions, la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») doit être modifiée en fonction de chaque délétion définie.

Utilisez la séquence de type sauvage :

**TATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAA
ATCCTCGAT**

et ajoutez des crochets au début et à la fin de la délétion.

Pour la deuxième délétion la plus fréquente dans l'exon 19 (2236del15), modifiez la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») de la façon suivante :

TATCAAG[GAATTAAGAGAAGCA]ACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA

A3. Ajoutez manuellement l'ordre de distribution (« Dispensation Order ») suivant.

CTATCACTGTCAGCTCGATCGTCATCGTCACGC

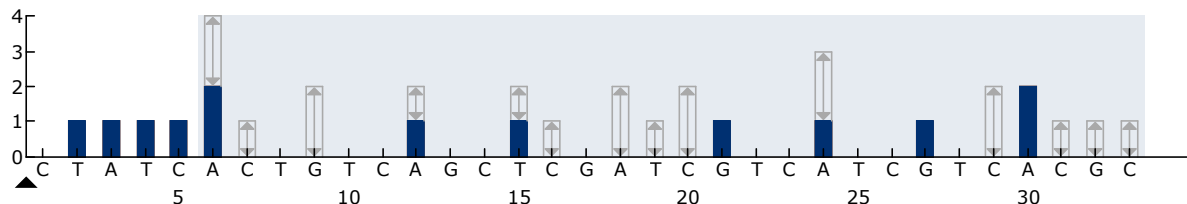




Figure 21. Histogramme pour l'exon 19 del.

- A4. Cliquez sur l'onglet « Analysis Parameters » (paramètres de l'analyse) et augmentez la valeur du champ « Peak Height Threshold - Required peak height for Passed Quality: » (seuil de hauteur de pic - hauteur de pic requise pour la validation de la qualité) jusqu'à 30.**
- A5. Cliquez sur  dans la barre d'outils et sauvegardez le test sous le nom « EGFR Exon 19 del »**

Annexe B : Vidange du conteneur à déchets et des cuves

AVERTISSEMENT 	Produits chimique dangereux <p>La solution de dénaturation utilisée avec la station de travail sous vide contient de l'hydroxyde de sodium qui peut irriter les yeux et la peau.</p> <p>Portez toujours des lunettes de sécurité, des gants et une blouse de laboratoire.</p> <p>La personne responsable (p. ex. le chef de laboratoire) doit prendre les précautions nécessaires pour s'assurer que l'espace de travail environnant est sûr et que les opérateurs travaillant sur l'instrument ne sont pas exposés à des niveaux dangereux de substances toxiques (chimiques ou biologiques) comme décrit dans les fiches de données de sécurité (FDS) ou dans les documents de l'OSHA*, de l'ACGIH† ou du COSHH‡.</p> <p>La ventilation pour évacuer les fumées et l'élimination des déchets doivent être conformes à toutes les réglementations et lois de sécurité sanitaire nationales, régionales et locales.</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Administration de la sécurité et de la santé au travail, États-Unis)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Conférence américaine des hygiénistes industriels gouvernementaux, États-Unis)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (contrôle des substances présentant des dangers pour la santé, Royaume-Uni)

Assurez-vous de respecter les réglementations environnementales nationales, régionales et locales concernant l'élimination des déchets de laboratoire.

Point important avant de commencer

- Ce protocole requiert l'utilisation d'eau ultra-pure (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com, ou équivalent).

Procédure

B1. Assurez-vous qu'aucun vide n'est appliqué à l'outil de vide. Assurez-vous que l'interrupteur à vide est fermé (Off) et que la pompe à vide est éteinte.

B2. Jetez toutes les solutions versées dans les cuves.

B3. Rincez les cuves avec de l'eau ultra-pure ou remplacez-les si nécessaire.

B4. Videz le conteneur à déchets.

Remarque : Le couvercle peut être retiré sans déconnecter le tubage.

B5. Si la station de travail sous vide doit être nettoyée (par exemple à cause de poussière ou de déversements), suivez les instructions du Manuel d'utilisation du PyroMark Q24.

Pour commander

Produit	Contenu	N° réf.
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit (24)	Pour 24 réactions sur les systèmes PyroMark Q24 : Amorces Séq, amorces de PCR, ADN de contrôle non méthylé, Master Mix PCR PyroMark, CoralLoad concentré, tampon de liaison PyroMark, tampon d'hybridation PyroMark, solution de dénaturation PyroMark, tampon de lavage PyroMark, mélange d'enzyme, mélange de substrat, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP et H ₂ O.	971480
PyroMark Q24 MDx	Plateforme de détection basée sur la séquence pour le pyroséquençage de 24 échantillons en parallèle	9001513
PyroMark Q24	Plateforme de détection basée sur la séquence pour le pyroséquençage de 24 échantillons en parallèle	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Station de travail sous vide (220 V) pour la préparation de 24 échantillons en parallèle, du produit PCR à la matrice simple brin	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Station de travail sous vide (220 V) pour la préparation de 24 échantillons en parallèle, du produit PCR à la matrice simple brin	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Logiciel d'application	9019063
PyroMark Q24 Software	Logiciel d'analyse	9019062
Accessoires		
PyroMark Q24 Plate (100)	Plaquette de réaction de séquençage à 24 puits	979301

* Royaume-Uni uniquement.

† Reste du monde.

Produit	Contenu	N° réf.
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartouches pour la distribution des nucléotides et des réactifs	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sondes à filtre réutilisables pour les postes de travail sous vide PyroMark Q96 et Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Pour la vérification de l'installation du système	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Pour la confirmation des performances du système	979304
Produits connexes		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pour 50 préparations d'ADN : 50 colonnes QIAamp MinElute [®] , protéinase K, tampons, tubes de prélèvement (2 mL)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Pour 48 préparations : Cartouches de réactifs (tissu), embouts à filtre jetables, portoirs d'embouts jetables, tubes d'échantillon (2 mL), tube d'élution (1,5 mL), tampon G2, protéinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Pour 50 préparations : Colonnes QIAamp Mini Spin, tampons, réactifs, tubes, VacConnectors	61104

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

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Marques déposées : QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ABI™ (Life Technologies Corporation); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag (Florida Scientific Services, Inc.); Windows® (Microsoft Corporation).

Accord de licence limitée

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du kit *therascreen* EGFR Pyro accepte les conditions suivantes :

1. Le kit *therascreen* EGFR Pyro ne doit être utilisé que conformément au *Manuel du kit therascreen EGFR Pyro* et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans le Manuel du kit *therascreen* EGFR Pyro et autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

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

© 2015 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

