

TheraScreen®

molecular diagnostics
for personalised medicine

TheraScreen® : K-RAS Mutation Kit

Pour la détection de 7 mutations du gène K-RAS

Pour une utilisation avec le système de PCR en temps réel Roche LightCycler® 480 (Instrument II)
(Référence du catalogue : 05015278001)
et avec le système de PCR en temps réel Applied BioSystems 7500
(Numéro d'article : 4351105)

Inclut le manuel de l'utilisateur pour le logiciel LightCycler® Adapt Software v1.1 de Roche Diagnostics (référence du catalogue 05474914001) pour le TheraScreen® : K-RAS Mutation Kit CE-IVD.

Instructions d'utilisation

Codes de produits

Taille du kit	Code de produit DxS	Numéro de commande Roche Diagnostics
20 réactions	KR-21	05366216190
80 réactions	KR-22	05366224190

Version des instructions : DU001g

Date de révision : mai 2009

À conserver entre -18 °C et -25 °C



Table des matières

1. Usage prévu / Indications d'utilisation	3
2. Résumé et explication du test.....	3
3. Principes technologiques.....	4
4. Réactifs.....	6
5. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	7
6. Conservation, stabilité et conditions d'expédition	9
7. Instrument	9
8. Prélèvements	9
9. Protocole de détection des mutations K-RAS.....	14
10. Limites du test	27
11. Caractéristiques des performances du test	28
12. Assistance technique.....	37
13. Coordonnées des fabricants et distributeurs	37
14. Date de publication de la dernière révision.....	37
15. Références	38
Remarques destinées à l'acquéreur :.....	40

⚠ IMPORTANT : lisez attentivement les instructions suivantes et familiarisez-vous avec tous les composants du kit K-RAS avant toute utilisation.

1. Usage prévu / Indications d'utilisation

Usage prévu

Le DxS TheraScreen® : K-RAS Mutation Kit (kit K-RAS) est un test de diagnostic *in vitro* conçu pour détecter sept mutations somatiques de l'oncogène K-RAS et fournir ainsi une évaluation qualitative de l'état mutationnel. Le kit K-RAS doit être utilisé par un personnel formé, dans un environnement professionnel de laboratoire, avec des échantillons d'ADN extraits de tissu colorectal fixé au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE).

Indications d'utilisation

Les résultats du kit K-RAS permettent d'aider le clinicien à identifier les patients présentant un cancer colorectal qui ne peuvent pas suivre une thérapie anti-REGF (récepteur de facteur de croissance épidermique), telle que le traitement au panitumumab ou au cétuximab.

Le kit K-RAS n'est pas destiné au diagnostic du cancer colorectal. Il vise à compléter d'autres facteurs pronostiques déterminants pour sélectionner les patients éligibles à un traitement basé sur des thérapies anti-REGF en fonction de leur état mutationnel. L'état mutationnel d'un patient sera pris en compte par le clinicien parallèlement à d'autres facteurs pathologiques avant de déterminer la thérapie à suivre. Aucune décision relative au traitement des patients atteints de cancer ne doit s'appuyer uniquement sur l'état mutationnel du gène K-RAS.

2. Résumé et explication du test

Le kit K-RAS est un dispositif de diagnostic certifié CE, conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.

Les mutations de l'oncogène K-RAS apparaissent fréquemment dans les cancers humains ⁽¹⁻⁴⁾. La présence de ces mutations est mise en corrélation avec un manque de réponse à certains traitements anticancéreux inhibiteurs de REGF chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique ⁽⁵⁻¹⁰⁾⁽¹⁴⁻²¹⁾.

La détection de sept mutations du gène K-RAS est possible grâce à une analyse de PCR en temps réel du bruit de fond de l'ADN génomique de type sauvage basée sur la technologie DxS Scorpions®. Cette méthode est extrêmement sélective. À condition qu'il y ait suffisamment de copies d'ADN, la détection de près d'1 % de mutants dans le bruit de fond d'un ADN génomique de type sauvage est possible.

Le kit K-RAS détecte sept mutations K-RAS dans les codons 12 et 13 de l'oncogène K-RAS, comme illustré dans le tableau 1.

Tableau 1 : mutations K-RAS détectées par le kit DxS

Les identifiants COSMIC sont tirés du catalogue des mutations somatiques associées au cancer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer).

<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>

Mutation	Changement de base	ID Cosmic
Gly12Ala	(GGT>GCT)	522
Gly12Asp	(GGT>GAT)	521
Gly12Arg	(GGT>CGT)	518
Gly12Cys	(GGT>TGT)	516
Gly12Ser	(GGT>AGT)	517
Gly12Val	(GGT>GTT)	520
Gly13Asp	(GGC>GAC)	532

3. Principes technologiques

Le kit K-RAS associe deux technologies, ARMS® et Scorpions®^(11, 12, 13), pour détecter les mutations dans les analyses de PCR en temps réel.

ARMS

L'amplification spécifique d'allèle ou de mutation s'effectue par le biais du système ARMS (système de mutation réfractaire par amplification). La *Taq* ADN polymérase permet d'établir une distinction efficace entre un appariement et un mésappariement à l'extrémité 3' d'une amorce de PCR. Des séquences aux mutations spécifiques peuvent être sélectionnées pour être amplifiées, même pour des échantillons où la majorité des séquences ne contient pas la mutation. En effet :

- Lorsque l'amorce est entièrement appariée, l'efficacité de l'amplification est maximale.
- Lorsque la base 3' est mésappariée, seule une amplification entraînant un faible bruit de fond peut se produire.

Scorpions

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

Au cours d'une réaction par PCR, lorsque la sonde s'hybride à l'amplicon, le fluorophore et le quencher se séparent. La fluorescence du tube de réaction augmente.

Analyse des données : méthode Δ Ct

Les analyses Scorpions en temps réel utilisent le nombre de cycles PCR nécessaire pour détecter un signal fluorescent supérieur à un signal de bruit de fond, afin de quantifier les molécules cibles présentes au début de la réaction.

Le point auquel le signal est détecté au-dessus de la fluorescence de bruit de fond est désigné par le terme de « seuil de cycle » (Ct pour cycle threshold).

Les valeurs ΔCt d'échantillons sont calculées sur la base de la différence entre le Ct de test de mutation et le Ct de test témoin du même échantillon. On estime que les échantillons présentent une mutation positive si leur ΔCt est inférieur à la valeur de ΔCt d'1 % de ce test.

Au-dessus de cette valeur, l'échantillon peut soit contenir moins d'1 % de mutation (au-delà de la limite des tests), soit ne pas présenter de mutation.

En utilisant des amorces ARMS, un amorçage inefficace peut survenir et entraîner un Ct de bruit de fond très tardif de l'ADN qui ne présente pas de mutation. Toutes les valeurs ΔCt calculées à partir de l'amplification basée sur le bruit de fond seront supérieures aux valeurs d'1 % de ΔCt : on estimera donc que l'échantillon ne présente pas de mutation.

Le kit K-RAS est certifié CE pour une utilisation de diagnostic *in vitro* sur le système de PCR en temps réel LightCycler® 480 de Roche Diagnostics (Instrument II) (Instrument LightCycler® 480) format 96 puits, numéro d'article Roche : 05015278001 ou sur le système de PCR en temps réel Applied BioSystems 7500, numéro d'article 4351105 (ABI7500).

Lorsqu'il est utilisé avec l'instrument LightCycler® 480, le kit K-RAS doit être associé avec le logiciel LightCycler® Adapt Software v1.1 pour TheraScreen® K-RAS Mutation Kit CE-IVD (logiciel LightCycler® Adapt Software). Ce logiciel a été développé afin d'automatiser le tracé d'un graphique positif ou négatif d'amplification et de calculer le bon seuil permettant d'obtenir les valeurs Ct. Ces dernières sont utilisées pour calculer les valeurs ΔCt des échantillons, lesquelles sont comparées avec les valeurs seuil d'1 %. Le logiciel transmet un résultat de mutation positif ou négatif et élimine toute subjectivité dans l'analyse et l'interprétation des données du kit K-RAS.

Format du kit K-RAS

Huit tests sont fournis dans le kit K-RAS

- Un test témoin
- Sept tests de mutation

Tous les mélanges réactionnels contiennent un test témoin exogène (témoin interne) marqué HEX (devant être détecté par le détecteur de marquage JOE sur l'instrument ABI7500). La présence d'inhibiteurs pouvant entraîner des faux négatifs peut ainsi être contrôlée.

Test témoin

Le test témoin, marqué FAM, est utilisé afin d'évaluer l'ADN total d'un échantillon. Le test témoin amplifie une région de l'exon 4 du gène K-RAS.

Les amorces et la sonde ont été conçues de façon à éviter tout polymorphisme connu du gène K-RAS.

Tests de mutation

Chaque test de mutation, marqué FAM, contient une sonde Scorpion et une sonde ARMS afin de distinguer l'ADN de type sauvage de l'ADN mutant détecté par une analyse de PCR en temps réel.

4. Réactifs

Le présent kit K-RAS contient suffisamment de réactifs pour procéder à une évaluation qualitative des échantillons et effectuer les tests K-RAS pour un maximum de 20 ou 80 réactions en fonction de la taille du kit.

Taille du kit	Code de produit DxS	Numéro de commande Roche Diagnostics
20 réactions	KR-21	05366216190
80 réactions	KR-22	05366224190

Le nombre d'échantillons pouvant être testés dépend de la taille du lot d'échantillon.

Tableau 2 : contenu du kit K-RAS

Réactifs fournis	20 réactions	80 réactions	Tube
	Volume	Volume	
Mélange réactionnel témoin	1 300 µL	5 200 µL	1
Mélange réactionnel 12ALA	650 µL	2 600 µL	2
Mélange réactionnel 12ASP	650 µL	2 600 µL	3
Mélange réactionnel 12ARG	650 µL	2 600 µL	4
Mélange réactionnel 12CYS	650 µL	2 600 µL	5
Mélange réactionnel 12SER	650 µL	2 600 µL	6
Mélange réactionnel 12VAL	650 µL	2 600 µL	7
Mélange réactionnel 13ASP	650 µL	2 600 µL	8
Standard mélangé	300 µL	1 000 µL	9
Taq ADN polymérase	60 µL	240 µL	10

Matériel et réactifs non fournis avec le kit K-RAS

L'utilisateur devra se procurer le matériel et les consommables suivants :

- Instrument LightCycler® 480 ou appareil de PCR en temps réel ABI7500 pouvant effectuer des cycles tel que défini dans la section 9, Protocole de détection des mutations K-RAS.
- Logiciel LightCycler® Adapt Software v1.1 de Roche Diagnostics (référence du catalogue 05474914001).
- Plaques PCR sans DNase 0,2 mL (plaque Multiwell à 96 puits pour l'instrument LightCycler® 480, référence du catalogue 04729692 001, ou plaque de réaction MicroAmp Optical à 96 puits, numéro d'article 4306737, avec le film adhésif MicroAmp Optical, numéro d'article 4311971).
- Tubes stériles pour la préparation des master mix.
- Pipettes dédiées pour la préparation des mélanges PCR.
- Pipettes dédiées pour la distribution de l'ADN matrice.
- H₂O stérile et sans nucléase.

5. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- ❖ Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro.
- ❖ Le kit K-RAS n'est pas destiné à dépister ou à diagnostiquer un quelconque type de cancer, y compris le cancer colorectal. Il vise à compléter d'autres facteurs pronostiques utilisés actuellement pour sélectionner les patients ne pouvant pas bénéficier de traitement anticancéreux anti-REGF.
- ❖ La thérapie pour les patients atteints de cancer ne doit en aucun cas s'appuyer uniquement sur le statut mutationnel du gène K-RAS. Le statut mutationnel d'un patient doit être pris en compte par un clinicien parallèlement à d'autres facteurs pathologiques.
- ❖ Le contenu du kit K-RAS peut être congelé et décongelé jusqu'à 8 fois sans que les performances du test n'en soient altérées. Veillez à NE PAS congeler et décongeler les réactifs du kit K-RAS plus de 8 fois.
- ❖ Veuillez noter que les échantillons tumoraux ne sont pas homogènes et que les données d'un échantillon tumoral donné peuvent ne pas concorder avec d'autres sections de la même tumeur. Les échantillons tumoraux peuvent également contenir du tissu non tumoral. L'ADN de tissu non tumoral n'est pas supposé contenir des mutations du gène K-RAS détectées par le kit K-RAS.
- ❖ Tous les tests du kit K-RAS génèrent des produits PCR courts. Toutefois, le kit K-RAS ne fonctionnera pas sur de l'ADN fortement fragmenté.
- ❖ L'évaluation de l'ADN doit être basée sur la PCR et peut différer de la quantification basée sur les résultats de densité optique. Le mélange réactionnel témoin supplémentaire est fourni afin d'évaluer la qualité et la quantité de l'ADN des échantillons avant d'utiliser le kit K-RAS.
- ❖ Les réactifs du kit K-RAS ont été dilués de façon optimale. Toute autre dilution du réactif n'est pas recommandée et entraînerait une baisse des performances. L'utilisation d'un volume réactionnel inférieur à 25 µl n'est pas recommandée et augmenterait le risque de faux négatifs.
- ❖ Tous les réactifs du kit K-RAS ont été formulés pour être utilisés spécifiquement avec les tests donnés. Afin de garantir des performances optimales, les réactifs du kit K-RAS ne doivent pas être remplacés.
- ❖ Pour garantir une activité et des performances optimales, les sondes Scorpions (tout comme toutes les molécules marquées en fluorescence) doivent être protégées de la lumière pour éviter tout photoblanchiment.

- ❖ Soyez extrêmement prudent pour éviter la contamination des réactions PCR avec le matériel témoin synthétique. Il est conseillé d'utiliser des pipettes distinctes et dédiées pour préparer les mélanges réactionnels et pour ajouter l'ADN matrice. La préparation et la distribution des mélanges réactionnels doivent être effectuées dans une zone séparée de celle de l'ajout de l'ADN matrice. Les tubes ne doivent jamais être ouverts après une réaction PCR.
- ❖ Chaque test inclus dans le kit K-RAS possède ses propres caractéristiques. Le calcul du résultat doit être établi en se référant aux paramètres de test corrects (voir la section Rapport/Interprétation des données).
- ❖ Les valeurs de Ct de mutation supérieures ou égales à 38 doivent être considérées comme négatives ou en-dessous des limites du kit.
- ❖ Les tests contiennent une réaction témoin exogène (contrôle interne) en plus de la réaction d'intérêt (voir la section Principes technologiques). Si les deux tests ont échoué, les données doivent être rejetées car l'éventuelle présence d'inhibiteurs peut entraîner des faux négatifs. La dilution de l'échantillon peut réduire l'effet des inhibiteurs ; mais il faut noter que l'ADN serait alors lui-aussi dilué.
- ❖ Les précautions générales de laboratoire doivent être suivies, notamment mais de manière non limitative :
 - a) Ne pas pipeter à la bouche
 - b) Ne pas fumer, manger ou boire dans les zones de manipulation des prélèvements ou des réactifs de kit
 - c) Se laver les mains après avoir effectué le test
- ❖ Utilisez uniquement la *Taq* polymérase (*Taq*) fournie dans le kit, ne la remplacez pas par une *Taq* d'autres kits similaires ou de tout autre type, ou par une *Taq* d'un autre fournisseur.
- ❖ Veillez à ne décongeler que les réactifs nécessaires pour chaque test, ne décongelez pas systématiquement tout le kit afin de minimiser le nombre de cycles de congélation/décongélation.

Informations de sécurité

Avertissement : tout le matériel chimique et biologique doit être considéré comme potentiellement dangereux. Les prélèvements présentent un risque potentiel d'infection et doivent être traités en conséquence.

Le kit K-RAS doit être utilisé uniquement par les personnes formées aux techniques appropriées de laboratoire. En travaillant avec les composants du kit K-RAS, veillez à toujours porter une blouse de laboratoire adéquate, des gants jetables et des lunettes de sécurité. Après utilisation, les composants du kit K-RAS doivent être mis au rebut comme déchets cliniques.

6. Conservation, stabilité et conditions d'expédition

Conservation

L'intégralité du contenu du kit K-RAS doit être stockée dès sa réception entre -18 °C et -25 °C, à l'abri de la lumière, dans un congélateur à température constante. Évitez toute congélation/décongélation inutile du contenu du kit K-RAS.

Stabilité

N'utilisez pas le kit K-RAS après la date de péremption indiquée. Le contenu du kit K-RAS est stable jusqu'à la date de péremption s'il est stocké conformément aux conditions de conservation recommandées et dans son emballage original.

Le contenu du kit K-RAS peut être congelé et décongelé jusqu'à 8 fois sans que les performances du test n'en soient altérées. Veillez à NE PAS congeler et décongeler les réactifs du kit K-RAS plus de 8 fois.

Conditions d'expédition

Le contenu du kit K-RAS est expédié sur un lit de glace sèche et doit être congelé dès l'arrivée. Si le kit K-RAS n'est pas congelé dès son arrivée, si l'emballage extérieur a été ouvert au cours du transport ou si le colis ne contient pas de notice d'emballage, d'instructions d'utilisation ou de réactifs, veuillez contacter votre bureau local Roche Diagnostics ; voir la section 12, Assistance technique, pour les coordonnées.

7. Instrument

Veillez consulter le manuel de l'utilisateur de l'instrument pour des instructions détaillées sur l'installation et l'utilisation de l'instrument de PCR en temps réel.

8. Prélèvements

Les prélèvements doivent être constitués d'ADN génomique humain, extrait d'échantillons de tumeurs colorectales fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE).

Prélèvement et préparation des échantillons

1. Transport des prélèvements : méthodologie standard de pathologie pour garantir la qualité du prélèvement.
2. Procédé recommandé pour le prélèvement : extraction d'ADN avec le kit de tissu FFPE ADN QIAamp® de Qiagen (référence du catalogue 56404).

Les modifications suivantes du protocole Qiagen doivent être prises en compte :

- Les tissus FFPE doivent être prélevés sur des lames en verre.
- L'excédent de paraffine doit être nettoyé autour des sections du tissu en grattant avec un scalpel stérile.

- Grattez le matériel de tissu dans des tubes de microcentrifugeuse en utilisant un nouveau scalpel pour l'extraction de chaque échantillon.
- La digestion de la protéinase K doit être poursuivie jusqu'à son achèvement, ce qui peut prendre jusqu'à 48 heures.
- Les échantillons doivent être élués dans 200 µL de tampon ATE du kit d'extraction Qiagen.

Toute autre méthode alternative de préparation d'échantillon doit être validée par l'utilisateur final.

3. Conservation de l'ADN extrait : conserver à -20 °C avant l'analyse.

Protocole d'évaluation de l'échantillon

Le mélange de test témoin supplémentaire fourni avec le kit K-RAS doit être utilisé pour évaluer l'ADN total d'un échantillon. Le test témoin amplifie une région de l'exon 4 du gène K-RAS. Les échantillons doivent être préparés uniquement avec le test témoin, en utilisant le standard mélangé comme contrôle positif et de l'eau comme contrôle négatif (NTC, no template control). Veuillez noter que pour une utilisation optimale des réactifs du kit K-RAS, les échantillons doivent être regroupés par lot. Toutes les analyses de contrôle doivent inclure des témoins. Si des échantillons sont testés individuellement, plus de réactifs seront utilisés ce qui diminue le nombre d'échantillons pouvant être testés avec le kit K-RAS.

Protocole d'évaluation de l'échantillon : préparation de la plaque

1. Décongelez à température ambiante le mélange réactionnel témoin et le standard mélangé du kit K-RAS. Une fois la décongélation terminée, mélangez chaque solution en retournant chaque tube 10 fois pour éviter toute concentration localisée de sel. Préparez des mélanges suffisants pour les échantillons d'ADN, une réaction de standard mélangé et une réaction de contrôle négatif (NTC) ainsi que 2 réactions supplémentaires.
2. Pour préparer le master mix, utilisez les quantités de réactifs par réaction données dans le tableau 3.

Tableau 3 : volumes du master mix du test témoin

Test	Master Mix	
	Mélange réactionnel (µL x 1)	Taq (µl) x 1
Test témoin	19,8	0,2

3. Veuillez NE PAS faire passer la Taq ou tout mélange réactionnel contenant de la Taq dans l'agitateur, l'enzyme pourrait être rendue inactive.

4. Assurez-vous que la *Taq* est à température ambiante avant son utilisation. Retournez la fiole pour vous assurer que toute la *Taq* s'accumule au fond, puis pipetez en plaçant la pointe de la pipette juste sous la surface de la *Taq* afin de minimiser le risque d'enrobage de la pointe dans une quantité excessive de *Taq*.
5. Mélangez le master mix en pipetant doucement l'ensemble.
6. Ajoutez immédiatement 20 µL du master mix témoin à chaque puits de réaction.
7. Ajoutez immédiatement 5 µL de l'échantillon, du standard mélangé ou de l'eau (pour les contrôles négatifs) aux puits de réaction.
8. La plaque doit être préparée en ajoutant le standard mélangé au puits A1 et le contrôle négatif (eau) au puits A2. Tous les autres puits doivent contenir les échantillons.
9. Fermez hermétiquement la plaque PCR et faites la tourner brièvement pour rassembler les réactifs au fond des puits.
10. Suivez les instructions de préparation de l'instrument pour la plateforme adéquate.

Protocole d'évaluation de l'échantillon – préparation de l'instrument LightCycler® 480

1. Placez immédiatement la plaque dans l'instrument LightCycler® 480.
2. Sélectionnez l'icône du logiciel LightCycler® 480 sur le bureau de la station de travail reliée à l'instrument. Connectez-vous au logiciel et sur l'écran « Overview », sélectionnez « New Experiment from Template ». Parmi les modèles d'analyses listés, choisissez « K-RAS LC480II Run Template ». Ce modèle sera paramétré de la façon suivante :
 1. Le format de détection est « DxS IVD Assays ».
 2. Le volume de réaction est 25.
 3. Une étape d'attente initiale à 95 °C pendant 4 minutes.
 4. Une amplification en deux étapes pour 45 cycles avec une dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes puis une hybridation à 60 °C pendant 1 minute. L'acquisition de la fluorescence est une acquisition unique qui s'effectue à l'étape de 60 °C.
3. Sélectionnez l'onglet « Sample Editor », puis, dans « Step 1: Select Workflow », cochez la case « Abs Quant ». Dans « Select Filter Combinations », assurez-vous que les deux filtres sont bien sélectionnés (465-510 nm et 533-580 nm). Définissez les noms des échantillons dans Step 2 et Step 3.

L'élément « Quantification Sample Type » doit être défini sur « unknown ». La colonne « Replicate » doit être laissée vierge.

4. Sélectionnez le bouton « Experiment » puis cliquez sur « Start Run » pour enregistrer l'expérience et démarrer le cycle.
5. À la fin de l'analyse, sélectionnez l'onglet « Analysis » puis choisissez « Abs Quant/2nd Derivative Max » dans la fenêtre « Create New Analysis ». Acceptez les paramètres par défaut dans l'écran « Create New Analysis ». Assurez-vous que le bouton « Filter Comb » affiche « 465-510 » et sélectionnez le bouton « Calculate ». Les valeurs de Ct sont affichées dans le tableau « Samples ».
6. Sélectionnez le bouton « Filter Comb » puis modifiez les filtres par 533-580 nm. Sélectionnez le bouton « Calculate » pour obtenir les valeurs de Ct du témoin exogène dans le tableau « Samples ».

Protocole d'évaluation de l'échantillon : préparation de l'instrument ABI7500

1. Placez immédiatement la plaque dans l'instrument ABI7500.
2. Sélectionnez l'icône du logiciel 7500 System sur le bureau de la station de travail reliée à l'instrument. Ouvrez un nouveau fichier d'analyse dans le menu « file » du logiciel 7500 Sequence Detection version 1.4.
3. Dans « Assay », sélectionnez « Standard Curve (Absolute Quantification) ». Dans « Run Mode », sélectionnez « Standard 7500 ».
4. Passez à la fenêtre de configuration du détecteur en cliquant sur le bouton « Next ». Ajoutez à la liste des détecteurs un détecteur FAM et un détecteur JOE, avec les quencher définis sur « none ». Si ces détecteurs n'existent pas, sélectionnez le bouton « New Detectors » puis configurez un détecteur FAM et un détecteur JOE avec le quencher défini sur « none ».
5. Réglez l'option « Passive Reference » sur « None » puis cliquez sur le bouton « Next ».
6. Sélectionnez la plaque entière et cochez les cases des détecteurs FAM et JOE pour que les deux témoins soient surveillés dans chaque puits. Cliquez sur le bouton « Finish ».
7. Sous l'onglet « Instrument », configurez les cycles comme dans le tableau 4.

Tableau 4 : paramètres des cycles de l'instrument ABI7500

Température	Temps	Cycles	Collecte de données
Étape 1			
95 °C	4 min	1	
Étape 2			
95 °C	30 sec		
60 °C	1 min	40	FAM, JOE

8. Cliquez sur le bouton « Start » pour enregistrer l'expérience et démarrer le cycle.
9. À la fin de l'analyse, assurez-vous que la référence passive est définie sur « none » dans l'écran d'inspection du puits. Dans l'onglet « Amplification Plot », sélectionnez tous les puits utilisés et sélectionnez le témoin JOE dans le menu déroulant du détecteur.
10. Vérifiez le signal JOE de chaque échantillon et comparez-le avec le signal JOE du puits NTC. Veuillez noter tout échantillon ayant une courbe d'amplification tardive ou dont l'amplification a échoué pour le témoin exogène par rapport au NTC.
11. Dans l'onglet « Amplification Plot », sélectionnez tous les puits utilisés et sélectionnez le témoin FAM dans le menu déroulant du détecteur. Utilisez le paramètre de ligne de base automatique et le Ct manuel puis définissez manuellement le seuil au milieu de la phase exponentielle, en utilisant l'échelle logarithmique pour l'axe Y, comme décrit dans le guide de l'utilisateur de l'instrument ABI7500.
12. Sélectionnez le bouton « Analyse » pour obtenir les valeurs de Ct.

Interprétation de l'évaluation de l'échantillon

Évaluez les valeurs de Ct de NTC pour vérifier qu'aucune contamination ne donne une amplification positive dans le canal FAM (Ct inférieur à 40) ou un échec de réaction de témoin exogène dans le canal HEX (pas de Ct), ce qui indique un problème de configuration. Le standard mélangé devrait donner un Ct de test témoin (canal FAM) de 26-29 sur l'instrument ABI7500 et ≤ 29 sur l'instrument LightCycler® 480. Les données ne doivent pas être utilisées en cas d'échec d'un de ces deux témoins.

Ct de test témoin à 29-35 : interprétez ces résultats avec prudence car des mutations de très faible niveau peuvent ne pas être détectées.

Ct de test témoin à 35-38 : seules quelques copies amplifiables d'ADN sont présentes dans de tels échantillons ; les mutations ne sont susceptibles d'être détectées que si la plupart des copies en comportent.

Ct de test témoin ≥ 38 : rejetez l'échantillon, car il contient très peu d'ADN et le kit K-RAS ne pourra pas détecter les mutations.

Veillez noter que si un échantillon donne un Ct de test témoin tardif, le Ct témoin exogène de l'échantillon doit être comparé avec le témoin exogène du NTC. Si le témoin exogène de l'échantillon est tardif ou négatif par rapport au NTC, cela peut indiquer la présence d'un inhibiteur. Il est possible de réduire l'effet d'un inhibiteur en diluant l'échantillon, mais l'ADN sera alors lui-aussi dilué.

Dilution d'échantillon : un Ct témoin < 24 surchargera les tests de mutation. Les échantillons avec un Ct témoin < 24 doivent être dilués. Veillez noter que pour l'instrument LightCycler® 480, les valeurs de Ct obtenues par le biais de la seconde méthode dérivative peuvent légèrement différer de celles obtenues avec le logiciel LightCycler® Adapt Software. Il est recommandé de diluer les échantillons concentrés afin qu'ils soient compris dans l'intervalle > 24 et < 29 (valeurs de Ct basées sur le logiciel 7500 Sequence Detection ou sur le logiciel de l'instrument LightCycler® 480) en considérant que la dilution de ½ augmentera le Ct d'1.

9. Protocole de détection des mutations K-RAS

- ❖ **Lisez attentivement les instructions suivantes et familiarisez-vous avec tous les composants du kit K-RAS avant toute utilisation.**

Pour utiliser de façon efficace le kit K-RAS, les échantillons doivent être regroupés par lot de 10 (afin de remplir une plaque de 96 puits). Avec des lots plus petits, moins d'échantillons pourront être testés avec le kit K-RAS.

Configuration expérimentale de l'instrument LightCycler® 480

Pour chaque échantillon d'ADN, les tests témoins et de mutation doivent être analysés avec la même analyse PCR afin d'éviter toute variation d'une analyse à l'autre.

1. Décongelez à température ambiante les mélanges réactionnels et le standard mélangé du kit K-RAS. Une fois la décongélation terminée, mélangez chaque solution en retournant chaque tube 10 fois pour éviter toute concentration localisée de sel. Préparez des mélanges suffisants pour les échantillons d'ADN, le standard mélangé et la réaction de contrôle négatif (NTC, no template control) ainsi que deux réactions supplémentaires par mélange, comme indiqué dans le tableau 5.

Tableau 5 : volumes du Master Mix K-RAS

Test	Master Mix			
	Mélange réactionnel (µL x 1)	Taq (µL) x 1	Mélange réactionnel (µL) par plaque (x 14)	Taq (µL) par plaque (x 14)
Test témoin	19,8	0,2	277,2	2,8
Tests de mutation	19,8	0,2	277,2	2,8

2. Veuillez NE PAS faire passer la *Taq* ou tout mélange réactionnel contenant de la *Taq* dans l'agitateur, l'enzyme pourrait être rendue inactive.
3. Assurez-vous que la *Taq* est à température ambiante avant son utilisation. Retournez la fiole pour vous assurer que toute la *Taq* est rassemblée au fond, puis pipetez en plaçant la pointe de la pipette juste sous la surface de la *Taq* afin de minimiser le risque d'enrobage de la pointe dans une quantité excessive de *Taq*.
4. Mélangez les master mix en pipétant doucement l'ensemble.
5. Ajoutez immédiatement 20 µL des master mix aux puits de réaction.
6. Ajoutez immédiatement 5 µL de l'échantillon, du standard mélangé ou de l'eau (pour les contrôles négatifs) aux puits de réaction. Chaque échantillon d'ADN doit être testé à la fois avec le témoin et avec tous les tests de mutation. Le paramétrage de la plaque est indiqué dans le tableau 6.

Tableau 6 : disposition de la plaque du kit K-RAS

Disposition avec 96 puits												
Test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Témoin	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
B 12ALA	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
C 12ASP	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
D 12ARG	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
E 12CYS	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
F 12SER	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
G 12VAL	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
H 13ASP	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10

7. Fermez hermétiquement la plaque PCR et faites la tourner brièvement pour rassembler les réactifs au fond des puits.
8. Placez immédiatement la plaque dans l'instrument LightCycler® 480.

Configuration de l'instrument LightCycler® 480

1. Sélectionnez l'icône du logiciel de l'instrument LightCycler® 480 sur le bureau de la station de travail reliée à l'instrument. Connectez-vous au logiciel et sur l'écran « Overview », sélectionnez « New Experiment from Template ».
2. Choisissez « K-RAS LC480II Run Template » sur la liste des modèles d'analyse (voir la section relative à l'évaluation de l'échantillon sur l'instrument LightCycler® 480 pour davantage de détails).
3. Sélectionnez l'onglet « Sample Editor », puis, dans « Step 1: Select Workflow », cochez la case « Abs Quant ». Dans « Select Filter Combinations », assurez-vous que les deux filtres sont bien sélectionnés (465-510 nm et 533-580 nm). Configurez les noms des échantillons dans Step 2 et Step 3. Dans la colonne 1, le nom de l'échantillon doit être Mixed Standard (standard mélangé). Dans la colonne 2, le nom de l'échantillon doit être NTC. Dans les colonnes 3 à 12, les noms des échantillons doivent être saisis. Les noms doivent être identiques pour tous les puits de la colonne 1. L'élément Quantification Sample Type doit être défini sur « unknown ». La colonne « Replicate » doit être laissée vierge : le logiciel LightCycler® Adapt Software ne prend pas en compte les réplicats.
4. Sélectionnez le bouton « Experiment » puis cliquez sur « Start Run » pour enregistrer l'expérience et démarrer le cycle.

Analyse d'échantillons sur l'instrument LightCycler® 480

1. À l'issue de l'analyse sur l'instrument LightCycler® 480, utilisez la fenêtre du navigateur pour exporter l'expérience (fichier .ixo) vers un emplacement approprié auquel le logiciel LightCycler® Adapt Software peut avoir accès.
2. **IMPORTANT** : l'utilisation du logiciel LightCycler® Adapt Software est validée pour un système informatique unique défini comme unité de contrôle unique (station de travail) fournie par Roche Diagnostics pour une utilisation avec un LightCycler® 480 Instrument II. Cette validation du logiciel LightCycler® Adapt Software concerne actuellement uniquement l'unité de contrôle que constitue un ordinateur autonome (c'est-à-dire qui ne fait pas partie d'un réseau). L'utilisation de tout autre ordinateur est interdite, le logiciel pouvant ne pas fonctionner correctement.
3. Lancez le logiciel LightCycler® Adapt Software en cliquant sur l'icône du logiciel LightCycler® Adapt Software sur le bureau de la station de travail et renseignez le champ du nom d'utilisateur. Ce nom sera utilisé pour indiquer l'auteur du rapport.

4. Dans la fenêtre principale, utilisez le bouton du navigateur pour sélectionner un seul fichier d'analyse pour l'instrument LightCycler® 480 (pour supprimer une sélection, le logiciel doit être fermé puis rouvert).
5. Sélectionnez un type de rapport (pdf ou csv). Si le format choisi est csv, une version pdf supplémentaire sera automatiquement créée.
6. Sélectionnez « Analyse » pour créer le rapport de résultat. Le rapport est automatiquement enregistré dans le dossier contenant le fichier d'analyse, sous le même nom que ce dernier.
7. Le rapport s'affichera automatiquement.
8. Le résultat est affiché dans la colonne « Mutation Status » du tableau « Sample Result Table ».

Interprétation des rapports du logiciel LightCycler® Adapt Software

1. Le rapport du logiciel LightCycler® Adapt Software présente des informations d'ordre général sur l'analyse.
 - 1.1. L'auteur du rapport est la personne qui a lancé le logiciel et créé le rapport.
 - 1.2. La date et l'heure de l'analyse sont indiquées.
2. Le rapport donne un aperçu de l'analyse précisant le nom du fichier d'analyse utilisé ainsi que le fichier de définition de l'algorithme et la séquence algorithmique. Les détails de l'algorithme sont fixés et ne peuvent pas être modifiés.
3. La section des résultats détaille le nom complet et le chemin d'accès au fichier d'analyse sur l'instrument LightCycler® 480, ainsi que les détails suivants :
 - 3.1. Le numéro de série de l'instrument LightCycler® 480.
 - 3.2. Nom de l'instrument : identifiant donné à l'instrument LightCycler® 480 dans le logiciel de l'instrument LightCycler® 480.
 - 3.3. Date de l'analyse : date et heure de l'analyse sur l'instrument LightCycler® 480.
 - 3.4. Opérateur de l'analyse : nom de la personne connectée sur le logiciel de l'instrument LightCycler® 480 lorsque l'expérience a été lancée.
 - 3.5. Nom de l'expérience : nom du fichier de l'analyse.
 - 3.6. Version du logiciel : version du logiciel utilisé avec l'instrument LightCycler® 480.
 - 3.7. Numéro de lot : tiré du champ « Lot No » de l'écran de configuration de l'expérience sur le logiciel de l'instrument LightCycler® 480.
4. La disposition de la plaque est donnée avec les noms des échantillons figurant sur l'écran « Sample editor » du logiciel de l'instrument LightCycler® 480.

5. Le résultat « Run Summary Result » est donné lorsque l'analyse est annoncée comme valide ou comme invalide, en fonction des témoins d'analyse des colonnes 1 et 2.
6. Témoins d'analyse
- 6.1. Le logiciel LightCycler® Adapt Software calcule automatiquement la valeur ΔCt pour le standard mélangé grâce à la formule suivante :
- $$\text{Ct de mutation} - \text{Ct témoin} = \Delta Ct$$
- 6.2. Le logiciel LightCycler® Adapt Software compare les valeurs avec les valeurs attendues données dans le tableau 7.

Tableau 7 : valeurs ΔCt attendues du logiciel LightCycler® Adapt Software

Test	ΔCt standard mélangé
12ALA	-0,61
12ASP	-0,61
12ARG	0,34
12CYS	-0,79
12SER	-0,13
12VAL	0,1
13ASP	-0,74

- 6.3. Les valeurs Ct et ΔCt sont reportées.
- 6.4. Les avertissements suivants apparaissent pour les témoins d'analyse dans les colonnes 1 et 2 :

Tableau 8 : Avertissements du logiciel LightCycler® Adapt Software pour les témoins d'analyse

Avertissement	Signification
CT_OUT_OF_RANGE	Le Ct FAM du test témoin est hors des limites.
EXO_FAIL	Pour le standard mélangé, le Ct témoin exogène est < 30 ou est négatif si le résultat FAM est négatif.
DELTA_CT_OUT_OF_RANGE	Les valeurs ΔCt mutation son hors des limites définies.
EXO_CONTROL_INVALID	La réaction du témoin exogène a échoué dans un NTC.
TARGET_CHANNEL_INVALID	La réaction FAM présente une valeur Ct positive dans un NTC.

- 6.4.1. Les significations des avertissements sont détaillées ci-dessous :
- 6.4.1.1. **CT_OUT_OF_RANGE** : le test témoin du standard mélangé doit présenter une valeur Ct de $26,60 \pm 2$.

Si le test dépasse est hors de ces limites, l'avertissement s'affichera pour tous les puits de standard mélangé car les valeurs ΔCt ne sont pas calculées et le standard mélangé est invalide. Cela indique que le test témoin ne fonctionne pas correctement.

- 6.4.1.2. **EXO_FAIL** : cet avertissement s'affiche si le test témoin exogène de l'un des puits de standard mélangé est inférieur à 30 ; une contamination PCR peut être présente dans ce mélange. Si le test témoin exogène échoue quand une réaction FAM échoue dans l'un des puits de standard mélangé, l'avertissement EXO_FAIL s'affiche également. Cela indique un problème avec ce test pouvant entraîner des faux négatifs. Le standard mélangé est déjà invalidé du fait de l'échec FAM.
- 6.4.1.3. **DELTA_CT_OUT_OF_RANGE** : si les valeurs ΔCt du standard mélangé sont comprises à $\pm 2,00$ des valeurs données dans le tableau 7, le logiciel signalera un statut valide. Si le ΔCt dépasse les limites attendues, le statut sera invalide et cet avertissement s'affichera. Cela indique un problème avec un test pouvant entraîner des résultats erronés.
- 6.4.1.4. **EXO_CONTROL_INVALID** : dans les puits NTC, le test témoin exogène doit donner un résultat positif dans les 8 puits ($Ct < 41$). Si un résultat négatif est obtenu, cet avertissement s'affiche et le statut est invalide. Cela indique un problème avec un test pouvant entraîner des résultats erronés.
- 6.4.1.5. **TARGET_CHANNEL_INVALID** : dans les 8 puits NTC, le résultat FAM doit être négatif ($CT > 38$). Toute amplification indique une contamination. Si le résultat est positif, cet avertissement s'affiche et le NTC est invalidé.

6.5. Dans le cas d'un statut invalide pour l'un des puits de standard mélangé ou pour les puits NTC, le « Run Summary Result » sera « Run Invalid ». Dans le tableau « Sample Result Table », les noms des échantillons et les valeurs Ct témoins seront reportés mais l'état mutationnel sera signalé comme « invalid ». Le standard mélangé indique que tous les tests fonctionnent correctement. Si ce n'est pas le cas, les résultats de mutation peuvent être des faux positifs ou des faux négatifs. Le NTC indique qu'il n'existe aucune contamination dans les master mix et que le témoin exogène fonctionne correctement.

6.6. Dans le cas peu probable où le logiciel LightCycler® Adapt Software affiche un message d'erreur, veuillez consulter l'Assistance technique, section 12.

7. Résultats des échantillons

- 7.1. Le tableau « Sample Result Table » indique les noms d'échantillons tirés du logiciel de l'instrument LightCycler® et des valeurs CT du test témoin.
- 7.2. Le logiciel LightCycler® 480 Adapt Software calculera les valeurs ΔCt et déterminera si la mutation d'un échantillon est positive ou négative en fonction des valeurs seuil d'1 % données dans le tableau 9.

Tableau 9 : valeurs seuil d'1 % du logiciel LightCycler® Adapt Software

Test	Delta Ct 1 %
12ALA	6,25
12ASP	7,72
12ARG	6,83
12CYS	6,95
12SER	8,95
12VAL	6,5
13ASP	9,09

- 7.3. Si la valeur ΔCt de mutation d'un échantillon est inférieure à la valeur seuil ΔCt d'1 % correspondante, l'échantillon présente une mutation. Le logiciel LightCycler® Adapt Software signalera quelle mutation est présente, mais n'indiquera qu'une seule mutation. Si deux valeurs ΔCt sont positives, la valeur la plus faible sera indiquée. On estime que la seconde valeur a été produite grâce à une réactivité croisée d'une liaison d'amorce à la mutation et d'une amorce d'une mutation différente. Dans les rares cas où une double mutation est présente, la décision clinique sera la même que pour les cas où une seule mutation est présente.
- 7.4. Si les valeurs ΔCt de l'échantillon sont supérieures aux valeurs ΔCt d'1 %, on considère que l'échantillon présente une mutation négative (il peut contenir une mutation, mais à un niveau inférieur à celui des limites du kit).
- 7.5. Avertissements
 - 7.5.1. Le logiciel LightCycler® Adapt Software signalera des avertissements pour les échantillons du tableau « Sample Result Table » comme décrit dans le tableau 10.

Tableau 10 : avertissements du logiciel LightCycler® Adapt Software pour les échantillons

Avertissement	Signification
REP_DILUTION	Le Ct témoin est inférieur à 24.
CONF_LEVEL	Le Ct témoin est supérieur à 28,9 et aucune mutation n'est reportée.
LIMITED	Le Ct témoin est supérieur à 35.
EXO_FAIL	Le test témoin exogène a échoué, la réaction FAM ayant aussi échoué dans une réaction de mutation, ou le Ct témoin exogène est inférieur à 30.
FAIL	Le logiciel ne peut pas déterminer si la courbe est positive ou négative.

7.5.2. Les significations des avertissements sont détaillées ci-dessous :

7.5.2.1. **REP_DILUTION** : Ct témoin < 24. Les tests ont été validés pour un niveau d'ADN donnant un Ct témoin de 24 ou plus. Si l'échantillon donne un Ct de test témoin inférieur, il devra être dilué pour qu'il puisse correspondre aux limites valides de fonctionnement.

7.5.2.2. **CONF_LEVEL** : Ct témoin > 28,9. Un avertissement CONF_LEVEL s'affichera pour un échantillon négatif dont le Ct témoin est > 28,9. Les valeurs Ct de mutation sont classées comme négatives ou dépassant les limites du kit si elles sont supérieures ou égales à 38. Le Ct témoin doit être inférieur ou égal à 28,9 afin de prévoir suffisamment d'ADN pour la détection d'1 % de mutation compte tenu des valeurs seuil d'1 % et de la valeur seuil de Ct de 38. Si le Ct témoin est supérieur à 28,9 et qu'une mutation est détectée, cette dernière apparaît et l'avertissement ne s'affiche pas puisque l'échantillon contient une mutation bien définie. Toutefois, si le Ct témoin est supérieur à 28,9 et que l'échantillon ne semble pas présenter de mutation, cet avertissement s'affiche pour signaler que des mutations de faible niveau peuvent avoir été omises. Plus le Ct témoin augmente au-delà de 28,9, plus la sensibilité de détection de la mutation diminue.

7.5.2.3. **LIMITED** : Ct témoin > 35. Cela indique la présence d'un ADN très peu amplifiable, seules des mutations présentes en très grand nombre peuvent être détectées. Dans les échantillons LIMITED, si une mutation positive donne un Ct < 38, la mutation sera toujours signalée comme valide et sera indiquée. La présence de mutations de faible niveau dans un échantillon au résultat négatif et à l'avertissement LIMITED ne peut pas être ignorée.

7.5.2.4. **EXO_FAIL** : le logiciel vérifie l'amplification de test témoin exogène pour établir l'éventuelle présence d'un inhibiteur; ce qui pourrait entraîner un faux négatif. La logique suivante est observée :

- a. La réaction témoin exogène sera évaluée uniquement dans les puits de réaction de la mutation et non dans le puits de test témoin, à l'exception des colonnes de standard mélangé et de NTC (voir point 6) ou en cas de Ct témoin exogène < 30.
- b. Si une mutation positive est détectée mais que le test témoin exogène a échoué dans le puits de mutation positive, l'avertissement EXO_FAIL ne s'affiche pas car la réaction FAM peut entraîner une inhibition compétitive. Le statut de mutation est valide.
- c. Si une mutation positive est détectée pour un échantillon dans un puits de mutation et si un test témoin exogène échoue dans un autre puits de mutation du même échantillon, la détection de mutation du premier puits sera prise en compte et le résultat sera valide. Toutefois, un avertissement EXO_FAIL s'affichera. Cela indique un problème avec le test du puits dans lequel a échoué le test témoin exogène, une mutation peut avoir été omise dans ce puits.

Il est possible que la mutation détectée soit une réactivité croisée entre les tests plutôt que la véritable mutation, qui a été omise. Toutefois, l'état mutationnel du test reportant la détection d'une mutation positive reste valide étant donné la présence d'une mutation bien définie et la décision clinique reste la même quelle que soit la mutation présente.

- d. Si l'échantillon est détecté comme négatif mais qu'une réaction de témoin exogène a échoué dans l'un des tests de mutation, l'avertissement EXO_FAIL sera affiché et le statut sera invalide. Il est possible qu'une mutation ait été omise.
- e. Si le Ct du test témoin exogène est < 30 dans l'un des 8 puits, un avertissement EXO_FAIL s'affichera et le statut sera invalide. Il est possible que ce test présente une contamination de produit PCR.
- f. Le fichier de l'analyse de l'instrument LightCycler® 480 peut être vérifié pour établir la cause possible de l'échec d'un test témoin exogène. Si toutes les réactions de témoin exogène ont échoué dans une colonne, il se pourrait qu'un inhibiteur soit présent. Si l'échec ne survient que pour un puits, il peut s'agir d'un problème de disposition de plaque.

- 7.5.2.5. **FAIL** : un avertissement FAIL s'affiche lorsque le logiciel ne parvient pas à déterminer si la courbe d'amplification est positive ou négative, par exemple si la forme de la courbe est anormale.
- 7.5.3. Le logiciel LightCycler® Adapt Software vérifie que le nom d'échantillon est identique au sein d'une même colonne, afin de s'assurer que les valeurs de Ct mutation et de Ct de test témoin utilisées pour calculer les valeurs Δ Ct proviennent du même échantillon. Les noms des échantillons sont tirés de l'écran « Sample editor » de l'instrument LightCycler® 480 dans le fichier de l'analyse. En cas de mésappariement en bas de la colonne, le logiciel affiche SAMPLE MISMATCH dans la colonne « Sample Name » du tableau « Sample Result Table ». Dans la disposition de la plaque, le logiciel reporte le nom de l'échantillon suivi de (MISMATCH). En cas d'erreur typographique, le nom peut être corrigé dans le fichier de l'analyse de l'instrument LightCycler® 480 et les données réanalysées avec le logiciel LightCycler® Adapt Software.

Configuration expérimentale de l'instrument ABI7500

Pour chaque échantillon d'ADN, les tests témoins et de mutation doivent être analysés avec la même analyse PCR afin d'éviter toute variation.

1. Décongelez à température ambiante le mélange réactionnel et le standard mélangé du kit K-RAS. Une fois la décongélation terminée, mélangez chaque solution en retournant chaque tube 10 fois pour éviter toute concentration localisée de sel. Préparez des mélanges suffisants pour les échantillons d'ADN, le standard mélangé et la réaction de contrôle négatif (NTC, no template control) ainsi que deux réactions supplémentaires par mélange, comme indiqué dans le tableau 11.

Tableau 11 : volumes du Master Mix K-RAS

Test	Master Mix			
	Mélange réactionnel (μ L x 1)	<i>Taq</i> (μ L) x 1	Mélange réactionnel (μ L) par plaque (x 14)	<i>Taq</i> (μ L) par plaque (x 14)
Test témoin	19,8	0,2	277,2	2,8
Tests de mutation	19,8	0,2	277,2	2,8

2. Veuillez NE PAS faire passer la *Taq* ou tout mélange réactionnel contenant de la *Taq* dans l'agitateur, l'enzyme pourrait être rendue inactive.

3. Assurez-vous que la *Taq* est à température ambiante avant son utilisation. Retournez la fiole pour vous assurer que toute la *Taq* est rassemblée au fond, puis pipetez en plaçant la pointe de la pipette juste sous la surface de la *Taq* afin de minimiser le risque d'enrobage de la pointe dans une quantité excessive de *Taq*.
4. Mélangez les master mix en pipétant doucement l'ensemble.
5. Ajoutez immédiatement 20 µL des master mix aux puits de réaction.
6. Ajoutez immédiatement 5 µL de l'échantillon, du standard mélangé ou de l'eau (pour les NTC) aux puits de réaction. Chaque échantillon d'ADN doit être testé à la fois avec le témoin et avec les tests de mutation. Le paramétrage de la plaque est indiqué dans le tableau 12.

Tableau 12 : disposition de la plaque K-RAS ABI7500

Disposition avec 96 puits												
Test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Témoin	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
B 12ALA	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
C 12ASP	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
D 12ARG	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
E 12CYS	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
F 12SER	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
G 12VAL	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
H 13ASP	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10

7. Fermez hermétiquement la plaque PCR et faites la tourner brièvement pour rassembler les réactifs au fond des puits.
8. Placez immédiatement la plaque dans l'instrument ABI7500.

Configuration de l'instrument ABI7500

1. Sélectionnez l'icône du logiciel 7500 System sur le bureau de la station de travail reliée à l'instrument. Ouvrez un nouveau fichier d'analyse dans le menu Fichier du logiciel 7500 Sequence Detection version 1.4.
2. Dans « Assay », sélectionnez « Standard Curve (Absolute Quantification) ». Dans « Run Mode », sélectionnez « Standard 7500 ».

3. Accédez à la fenêtre de configuration du détecteur en cliquant sur le bouton « Next ». Ajoutez à la liste des détecteurs un détecteur FAM et un détecteur JOE, avec les quenchers définis sur « none ». Si ces détecteurs n'existent pas, sélectionnez le bouton « New Detectors » puis configurez un détecteur FAM et un détecteur JOE avec le quencher défini sur « none ».
4. Réglez l'option « Passive Reference » sur « None » puis cliquez sur le bouton « Next ».
5. Sélectionnez la plaque entière et cochez les cases des détecteurs FAM et JOE pour que les deux témoins soient surveillés dans chaque puits. Cliquez sur le bouton « Finish ».
6. Sous l'onglet « Instrument », configurez les cycles comme dans le tableau 13.

Tableau 13 : paramètres des cycles de l'instrument ABI7500

Température	Temps	Cycles	Collecte de données
Étape 1			
95 °C	4 min	1	
Étape 2			
95 °C	30 sec		
60 °C	1 min	40	FAM, JOE

7. Cliquez sur le bouton « Start » pour enregistrer l'analyse et démarrer le cycle.

Analyse de l'échantillon avec l'instrument ABI7500

1. Assurez-vous que la référence passive est définie sur « none » dans l'écran « Well inspector ».
2. Vérifiez que chaque puits donne un signal JOE à partir du test témoin exogène.
 - a. Si le test témoin exogène donne un résultat positif, continuez l'analyse.
 - b. Si le test témoin exogène a échoué mais que la réaction FAM a fortement amplifié, poursuivez l'analyse, car la réaction FAM a supplanté la réaction témoin exogène.
 - c. Si la réaction FAM et la réaction témoin exogène ont toutes les deux échoué, les données doivent être rejetées, car d'éventuels inhibiteurs peuvent être présents. Ces inhibiteurs peuvent entraîner des faux négatifs.
3. Dans l'onglet « Amplification Plot », sélectionnez tous les puits utilisés et sélectionnez le témoin FAM dans le menu déroulant du détecteur.

Utilisez le paramètre de ligne de base automatique et le Ct manuel puis définissez le seuil manuellement au milieu de la phase exponentielle, en utilisant l'échelle logarithmique pour l'axe Y, comme décrit dans le guide de l'utilisateur de l'instrument ABI7500.

4. Analysez les données et calculez la valeur ΔCt de la façon suivante :
 $[Ct \text{ de test de mutation d'échantillon}] - [Ct \text{ de test témoin d'échantillon}] = \Delta Ct$
 Les données peuvent être exportées dans Microsoft Excel pour faciliter l'analyse.

Interprétation des données avec l'instrument ABI7500

1. Valeurs Ct témoins :
 - 1.1. La valeur Ct témoin doit être ≥ 24 pour éviter toute surcharge du test.
 - 1.2. Ct témoin < 29 : le kit K-RAS peut détecter 1 % de mutation dans ces échantillons.
 - 1.3. Dans les échantillons où le Ct témoin est ≥ 29 , le kit ne détectera pas de valeur aussi faible que 1 % de mutation, mais pourra détecter des mutations de niveau plus élevé.
 - 1.4. Ct témoin ≥ 35 : seules quelques copies amplifiables d'ADN sont présentes dans l'échantillon ; les mutations ne sont susceptibles d'être détectées que si la plupart des copies en comportent.
 - 1.5. Ct témoin ≥ 38 : l'ADN pose une limite et les données ne doivent pas être utilisées.
2. Valeurs ΔCt de standard mélangé
 - 2.1. Les valeurs ΔCt de standard mélangé doivent correspondre à celles figurant dans le tableau 14, mais des variations de ± 2 peuvent survenir à cause de paramètres de seuil différents sur d'autres instruments.

Tableau 14 : valeurs ΔCt de standard mélangé et points seuil d'1 % avec l'instrument ABI7500

Tests	ΔCt standard mélangé	Limites acceptables pour le standard mélangé	ΔCt d'1 % de l'échantillon
12ALA	-0,70	-2,70 à 1,30	6,5
12ASP	-1,04	-3,04 à 0,96	8
12ARG	-0,02	-2,02 à 1,98	8
12CYS	-0,98	-2,98 à 1,02	7
12SER	0,02	-1,98 à 2,02	9
12VAL	-0,19	-2,19 à 1,81	6,5
13ASP	-1,12	-3,12 à 0,88	9

3. Valeurs ΔCt d'échantillon :
 - 3.1. Si la valeur ΔCt de l'échantillon est supérieure à la valeur d'1 % (comme indiqué dans le tableau 14), l'échantillon d'ADN est classé comme présentant une mutation négative ou en-dessous des limites du kit K-RAS.
 - 3.2. Si le ΔCt de l'échantillon est inférieur à la valeur d'1 %, l'échantillon d'ADN est classé comme présentant une mutation positive.
 - 3.3. Les valeurs de Ct de mutation supérieures ou égales à 38 doivent être considérées comme négatives ou en-dessous des limites du kit.

10. Limites du test

Le Ct de test témoin de l'échantillon doit être < 29 sur l'instrument ABI7500 et $< 28,9$ sur l'instrument LightCycler® 480 pour détecter 1 % de mutation dans le bruit de fond d'un ADN de type sauvage. Les tests ne seront pas toujours en mesure de détecter la mutation d'1 % dans les échantillons avec des valeurs de Ct témoin plus importantes et la sensibilité de détection des mutations diminuera à mesure qu'augmentera le Ct témoin au-delà de ces valeurs.

La valeur Ct témoin de l'échantillon d'ADN s'appuie sur la concentration telle qu'elle est déterminée par PCR. Les valeurs basées sur les résultats de densité optique ne correspondent pas aux valeurs Ct de test témoin dans les échantillons d'ADN fragmenté. Un mélange réactionnel témoin supplémentaire est fourni pour permettre une évaluation du Ct de l'échantillon avant d'utiliser le kit.

Si l'échantillon donne un résultat de mutation positif où le Ct de mutation ≥ 38 , le test doit être considéré comme négatif ou inférieur aux limites du kit. Cela est automatiquement effectué par le logiciel LightCycler® Adapt Software.

Des réactivités croisées peuvent survenir entre des réactions de mutation. Par exemple, si un niveau élevé de mutation 12ALA est détecté, certaines des autres réactions de mutation donneront aussi un résultat positif. Cela est dû aux amorces ARMS qui détectent d'autres mutations à quelques bases l'une de l'autre. Sur le matériel de contrôle synthétique, la réactivité croisée forme un modèle lisible sur l'instrument ABI7500 permettant de distinguer le vrai signal positif à partir de plusieurs signaux (voir tableau 15).

Tableau 15 : modèle de réactivité croisée sur l'instrument ABI7500 à partir du matériel de contrôle synthétique

« Oui » indique le vrai signal. Les chiffres indiquent le nombre approximatif de cycles après le vrai signal où un signal de réactivité croisée peut être détecté. Les valeurs n'ont pas été entrées au-delà de 9 cycles, car elles seront dans la zone négative.

Échantillon positif	Signal 12ALA	Signal 12ASP	Signal 12ARG	Signal 12CYS	Signal 12SER	Signal 12VAL	Signal 13ASP
12ALA	Oui	9	-	6	3	6	-
12ASP	9	Oui	-	-	-	-	-
12ARG	-	-	Oui	-	-	-	-
12CYS	-	7	4	Oui	-	-	-
12SER	9	6	9	-	Oui	-	8
12VAL	4	-	-	-	-	Oui	-
13ASP	-	-	-	-	-	-	Oui

Remarque : le modèle de réactivité croisée peut être différent sur les échantillons d'ADN, par exemple sur les échantillons d'ADN inclus en paraffine.

Le kit K-RAS vise à détecter une mutation dans un échantillon d'ADN. Si le second test de mutation donne un résultat positif, il est possible qu'il s'agisse de réactivité croisée. Bien que ceci soit rare, des doubles mutants ont été observés. Si le modèle ne correspond pas au modèle de réaction croisée, d'autres analyses peuvent s'avérer nécessaires.

11. Caractéristiques des performances du test

Les performances du test ont été caractérisées pour le kit K-RAS sur l'instrument ABI7500 et sur l'instrument LightCycler® 480 (avec le logiciel LightCycler® Adapt Software pour obtenir les valeurs de Ct). Toute une série de tests ont été effectués sur chaque instrument. Les résultats de ces tests sont résumés ci-dessous.

Validation du seuil d'1 % :

Instrument LightCycler® 480 : La détection d'une mutation d'1 % dans le bruit de fond de l'ADN d'une lignée cellulaire de mutation K-RAS négative a été déterminée sur une plage de trois concentrations différentes d'ADN de lignées cellulaires afin d'attribuer une valeur ΔCt seuil à chaque test de mutation.

Pour chaque test, 1 % de standards ont été testés en triplicat, sur 3 analyses séparées, à la fois pour le test témoin et pour le test de mutation. 3 opérateurs différents ont répété ces tâches. Les valeurs de Ct ont été obtenues grâce au logiciel LightCycler® Adapt Software.

Les valeurs ΔCt d'1 % ont été calculées à partir de toutes les combinaisons des valeurs Ct de mutation et des valeurs Ct témoins sur les réplicats d'une analyse.

Les valeurs ΔCt ont été définies comme la valeur moyenne de toutes les analyses et concentrations. Les résultats de ce test ont été résumés dans la section relative à l'interprétation des données.

ABI7500 : pour chaque test, 1 % de dilutions a été testé en triplicat, pour 3 lots de kits, sur 3 analyses séparées, à la fois pour le test témoin et pour le test de mutation. Le standard mélangé a été utilisé sur chaque plaque pour que les tests soient effectués conformément aux critères spécifiés.

Les valeurs ΔCt d'1 % ont été calculées à partir de la moyenne des valeurs Ct sur les réplicats d'une même analyse et d'un même lot. Les valeurs ΔCt seuil ont été définies comme la valeur moyenne (arrondies à 0,5) de tous les lots, analyses et concentrations, pour des concentrations où tous les réplicats donnaient une valeur de Ct. Les résultats de ce test sont résumés dans le tableau 16 ci-dessous.

Tableau 16 : résultats de validation des valeurs seuil d'1 % avec ABI7500

Test	Moyenne	Valeurs ΔCt d'1 %
12ALA	6,68	6,5
12ASP	8,2	8
12ARG	8,16	8
12CYS	6,94	7
12SER	8,83	9
12VAL	7,67	7,5*
13ASP	8,89	9

* La valeur seuil d'1 % pour 12Val a été changée par 6,5 conformément à l'étude de rupture. Voir la discussion ci-dessous.

Détermination du ΔCt de standard mélangé :

Instrument LightCycler® 480 : les valeurs ΔCt de standard mélangé sont les valeurs moyennes de 50 analyses où le standard mélangé a été testé. Les valeurs de Ct ont été obtenues grâce au logiciel LightCycler® 480 Adapt Software.

Les valeurs ΔCt attendues pour le standard mélangé sont données dans la section relative à l'interprétation des données.

ABI7500 : les valeurs de standard mélangé ont été définies à partir de la moyenne de 422 valeurs ΔCt . Ces dernières ont été calculées à partir de nombreux lots de kit et analyses différents.

Les valeurs ΔCt attendues pour le standard mélangé sont données dans la section relative à l'interprétation des données.

Validation de la rupture : la rupture est définie comme l'amplification non-spécifique dans les tests de mutation d'une cible d'ADN de type sauvage présente dans un échantillon donné. Cela entraîne un degré mesurable de bruit de fond. La rupture de l'ADN de type sauvage a été évaluée pour chaque test de mutation. L'étude de la rupture a garanti que les valeurs seuil d'1 % précédemment établies étaient inférieures au niveau de rupture, ce qui empêcherait le rapport d'un faux négatif.

Instrument LightCycler® 480 : dix échantillons d'ADN de lignée cellulaire de mutation K-RAS négative à différentes concentrations, 5 échantillons FFPE de mutation K-RAS négative et 5 échantillons FFPE de mutation K-RAS positive ont été testés en duplicat sur 5 plaques. Les échantillons présentant une mutation positive étaient positifs pour une mutation, et les autres mutations ont été utilisées pour tester la rupture. Les valeurs de Ct ont été obtenues grâce au logiciel LightCycler® Adapt Software et toutes les combinaisons des valeurs de Ct ont été utilisées pour calculer les valeurs ΔCt .

Les résultats des tests d'ADN de lignée cellulaire et d'échantillons FFPE présentant une mutation négative ont donné des valeurs ΔCt toutes supérieures aux valeurs seuil d'1 %, ce qui confirme que ces dernières sont robustes. Le tableau 17 montre les plus faibles niveaux de rupture à partir des 5 analyses.

Tableau 17 : résultats de rupture

Test	Valeurs ΔCt de rupture les plus faibles
12ALA	12,35
12ASP	11,36
12ARG	Pas de rupture
12CYS	Pas de rupture
12SER	11,74
12VAL	12,29
13ASP	11,29

ABI7500 : la rupture a été évaluée en utilisant un pool d'ADN de lignée cellulaire à partir de lignées cellulaires de mutation K-RAS négative à 3 différents niveaux d'ADN. Trois plaques PCR identiques ont été testées. Chaque plaque comprenait 3 lots de réactifs. Le standard mélangé a servi de témoin positif. De plus, les échantillons FFPE positifs ont été testés en duplicat. La majorité des échantillons présentant une mutation positive ne sont positifs que pour une mutation. Les autres tests de mutation peuvent être utilisés pour évaluer la rupture (même si une certaine réactivité croisée est attendue entre certains tests et des mutations positives, selon un modèle toutefois connu). Les valeurs de Ct et les valeurs ΔCt ont été obtenues et comparées aux valeurs seuil d'1 %.

Les données d'ADN de lignée cellulaire et d'échantillons FFPE ont donné des valeurs ΔCt toutes supérieures aux valeurs seuil d'1 %, sauf pour un échantillon FFPE qui a donné une valeur ΔCt située juste en dessous (6,84) du seuil de 7,5. Comme les limites des données de détermination du seuil d'1 % incluaient la valeur de 6,84, la valeur ΔCt d'1 % pour le test 12VAL a été modifiée de 7,5 à 6,5 pour écarter l'éventualité d'un faux positif. Le tableau 18 ci-dessous montre les valeurs ΔCt d'1 % actuelles basées sur les résultats de validation de rupture.

Tableau 18 : résultats de validation de la rupture

Test	Valeurs Δ Ct d'1 %
12ALA	6,5
12ASP	8
12ARG	8
12CYS	7
12SER	9
12VAL	6,5
13ASP	9

Validation de la précision :

Instrument LightCycler® 480 : la précision a été testée en utilisant 1 % de contrôles synthétiques à trois différents niveaux d'ADN de lignée cellulaire présentant une mutation K-RAS négative. Chaque témoin a été testé en triplicat pour le test correspondant sur une plaque contenant également des duplicats de standards mélangés et des simplicats de réactions NTC pour garantir le bon fonctionnement des réactions conformément aux spécifications. La même plaque a été répétée 54 fois sur une période de 6 jours. 3 instruments, 3 lots de réactifs et 3 opérateurs ont été intégrés à cette matrice d'analyses.

Les valeurs de Ct ont été obtenues grâce au logiciel LightCycler® Adapt Software et toutes les combinaisons des valeurs de Ct ont été utilisées pour calculer les valeurs Δ Ct. Toute valeur Δ Ct dépassant trois fois l'écart interquartile a été désignée comme observation aberrante et retirée de l'analyse. Les moyennes, les erreurs types et les écarts types ont été calculés et les données regroupées selon le lot du kit, l'instrument ou l'opérateur, afin d'évaluer la variation de ces variables. La répétabilité générale des tests a aussi été évaluée.

Les données indiquent que la variabilité générale des tests est faible et que 2 écarts types autour de la moyenne couvrent une plage de $\pm 1,4$ cycles de la moyenne pour le test avec l'écart type maximal.

Pour chaque test, la valeur Δ Ct moyenne de chaque opérateur était comprise à plus ou moins 0,15 cycles de la moyenne générale pour tout l'ensemble des données. Les différences entre les opérateurs n'excédaient pas 0,2 Ct, ce qui montre que la variation interopérateur n'était pas plus importante que la variation dans tout l'ensemble de données et que les tests sont suffisamment robustes pour supporter la variabilité interopérateur.

Pour chaque test, la différence entre les moyennes pour les instruments individuels et la moyenne générale était de $\pm 0,097$ et la différence entre les moyennes pour les instruments individuels n'excédait pas $\pm 0,186$, ce qui montre que la variation interinstrument n'était pas plus importante que la variation dans tout l'ensemble des données et que les tests sont suffisamment robustes pour supporter la variabilité interinstrument.

Pour chaque test, la plus grande différence entre un lot donné et la moyenne générale était de $\pm 0,195$, et les plus grandes différences interlots étaient de $\pm 0,38$, ce qui montre que la variation interlot n'était pas plus importante que la variation dans tout l'ensemble des données et que les tests sont suffisamment robustes pour supporter la variabilité interlot.

ABI7500 : les expériences ont été menées pour établir les performances de précision de chaque test en répétant une plaque PCR avec une série d'échantillons à concentration élevée et faible en ADN et de niveau de mutation élevé et faible, pour trois lots de réactifs pendant une même journée, entre des journées, entre des opérateurs et entre des instruments.

Une ANOVA à sens unique a été utilisée pour évaluer la variation entre les réplicats, les lots de réactifs, les analyses, les jours de test, les instruments et les opérateurs. D'après l'hypothèse nulle, les valeurs moyennes à travers les différentes catégories étaient égales. Les moyennes totales, l'écart type et le pourcentage du coefficient de variation ont également été calculés pour les valeurs de Ct.

Aucun des tests n'a montré d'écart significatif au niveau $p=0,05$ pour l'hypothèse nulle des moyennes égales entre les catégories. Cela indique que les tests sont suffisamment robustes pour supporter les variations d'un instrument à l'autre, d'un opérateur à l'autre, d'un lot à l'autre, d'un jour à l'autre et d'une analyse à l'autre.

Validation de l'exactitude :

Instrument LightCycler® 480 : l'exactitude a été évaluée en utilisant 92 échantillons FFPE et 28 dilutions de lignées cellulaires présentant une mutation positive. Ils ont été testés avec le kit K-RAS et ont également été séquencés en utilisant la méthode Sanger. Les détections de mutation K-RAS ont été comparées entre les 2 méthodes et 18 résultats divergents ont été trouvés (5 FFPE et 13 lignées cellulaires), pour lesquels le séquençage a indiqué des résultats négatifs alors que le test DxS donnait l'échantillon comme positif. Pour confirmer la présentation d'une mutation dans ces 18 échantillons, la région située autour des mutations a été clonée pour chacun d'entre eux. La présence d'un clone présentant une mutation positive a été utilisée pour résoudre ces divergences.

ABI7500 : l'exactitude a été évaluée en utilisant des contrôles synthétiques dilués dans 2 niveaux d'ADN de lignée cellulaire présentant une mutation K-RAS négative afin de donner 3 pourcentages différents de mutation couvrant à la fois les niveaux de mutation positive et les niveaux de mutation négative. Trois plaques identiques utilisant chacune 3 lots de réactifs ont été utilisées pour chaque mutation. Des niveaux de mutation de 25 %, 5 % et 0,5 % ont été testés. (Les échantillons de 25 % et de 5 % devaient donner un résultat de mutation positif (ΔCt inférieur aux valeurs seuil d'1 %) ; l'échantillon de 0,5 % devait donner un résultat de mutation négatif (ΔCt supérieur aux valeurs seuil d'1 %)). Les résultats sont résumés dans le tableau 19 ci-dessous.

Tableau 19 : résultats de validation de l'exactitude avec **ABI7500**

Test	25 %	5 %	0.5 %
Test	100 %	100 %	94 %
12ALA	100 %	100 %	100 %
12ASP	100 %	100 %	100 %
12ARG	100 %	100 %	100 %
12CYS	100 %	100 %	100 %
12SER	100 %	100 %	100 %
12VAL	100 %	100 %	100 %
13ASP	100 %	100 %	100 %

Le taux plus faible de l'exactitude du test 12ALA s'explique par la variation entre les réplicats à un niveau d'ADN.

Validation de la linéarité :

Instrument LightCycler® 480 : la linéarité a été évaluée en utilisant des standards synthétiques à des niveaux de mutation de 100 %, 1 % et 0 % pour chaque test. À chaque pourcentage de mutation, une dilution de série a été effectuée pour maintenir le niveau de mutation tout en réduisant la quantité totale d'ADN. Les courbes standard ont été produites en analysant chaque dilution en triplicat sur 3 plaques de réplicat pour le test témoin et le test de mutation correspondant. Les valeurs de Ct ont été produites en utilisant le logiciel LightCycler® Adapt Software. Un graphique a été tracé pour chaque mutation (données non illustrées) avec le report du Ct de test témoin et du Ct de test de mutation, et une régression a été effectuée pour chaque niveau de mutation. Les intervalles de confiance de 95 % ont aussi été tracés pour chaque niveau de mutation.

Aucune valeur de Ct de mutation n'a été obtenue dans le test à 0 %. Les graphiques de 100 % et d'1 % ont montré une distinction évidente entre les ensembles de données ; les pentes des courbes étaient essentiellement similaires, ce qui indique une efficacité d'amplification semblable à travers une série de concentrations de mutation.

ABI7500 : cette étude a évalué l'efficacité de chaque test de mutation à travers une série de concentrations d'ADN dans un bruit de fond d'ADN de type sauvage et dans de l'eau. Chaque test de mutation devrait avoir une efficacité de 90 à 110 % (100 % \pm 10 %).

Les courbes standard ont été définies en utilisant une dilution en série de 5 fois et une plaque PCR contenant trois lots de réactifs de kit a été analysée pour chaque test. Les standards de mutation à 100 % ont été testés à 50 ng, 10 ng, 2 ng et 0,4 ng d'ADN sur chaque test de mutation en diluant dans l'eau. Les tests de mutation ont également été testés en utilisant une dilution en série de 5 fois dans 10 ng/ μ L d'ADN de lignée cellulaire pour évaluer l'effet de la rupture.

Les courbes standard ont été générées pour chaque test de mutation à partir des données expérimentales. L'efficacité du PCR a été calculée selon l'équation suivante :

$$100((10^{-1/Pente})-1)$$

Le niveau plus élevé de rupture dans les dilutions de lignée cellulaire de 10 ng/μL a montré une efficacité de plus de 100 %.

L'efficacité générale à travers les lots de réactifs a été calculée. Toutes les valeurs étaient similaires et comprises à plus ou moins 10 % de l'efficacité du test témoin. Les courbes standard parallèles entre le test témoin et les tests de mutation indiquent que la méthode d'analyse ΔCt peut être utilisée.

La linéarité a été maintenue à un niveau acceptable entre 0,4 ng d'ADN et 50 ng d'ADN.

Validation de la réactivité croisée :

Instrument LightCycler® 480 : la validation de la réactivité croisée n'a pas été faite car le logiciel LightCycler® Adapt Software ne reporte qu'une seule mutation avec la valeur ΔCt la plus faible.

ABI7500 : comme toutes les mutations détectées par le kit K-RAS surviennent dans une région à 5 paires de bases, une certaine réactivité croisée est attendue entre les amorces. Cette étude a déterminé le modèle de réactivité croisée pour le kit K-RAS.

Le test a été effectué en utilisant des témoins de mutation synthétiques pour établir le nombre de cycles suivant un vrai positif après lequel on pouvait détecter un signal de réactivité croisée. Chaque mélange réactionnel de mutation a été lancé avec six réplicats des sept témoins de mutation individuelle à 100 %. De plus, chaque témoin a été testé avec le mélange réactionnel correspondant et tous les autres mélanges réactionnels pour la même expérience.

Le modèle de réactivité croisée a été déterminé en calculant la différence entre la valeur Ct de la véritable amplification de la cassette correspondante et le signal de réactivité croisée d'une amorce sur deux.

Le modèle attendu de réactivité croisée est illustré dans le tableau 20 ci-dessous. Le modèle de réactivité croisée est cohérent et permet à l'utilisateur de lire un modèle d'amplification où plus d'un test donne un résultat positif afin d'obtenir le résultat de test correct. Les chiffres de chaque cellule indiquent le nombre approximatif de cycles après le vrai signal positif où un signal de réactivité croisée peut être détecté. Les valeurs supérieures à 9 cycles n'ont pas été incluses parce qu'elles sont classées comme des résultats de mutation négative.

Tableau 20 : résultats de validation de réactivité croisée avec **ABI7500**

Échantillon positif	Signal 12ALA	Signal 12ASP	Signal 12ARG	Signal 12CYS	Signal 12SER	Signal 12VAL	Signal 13ASP
12ALA	Oui	9	-	6	3	6	-
12ASP	9	Oui	-	-	-	-	-
12ARG	-	-	Oui	-	-	-	-
12CYS	-	7	4	Oui	-	-	-
12SER	9	6	9	-	Oui	-	8
12VAL	4	-	-	-	-	Oui	-
13ASP	-	-	-	-	-	-	Oui

Validation de la tolérance de cycle:

Instrument LightCycler® 480 : ces études ont déterminé la tolérance des tests de mutation aux variations de température de cycle. Comme la température d'hybridation est la température la plus critique pouvant affecter les performances du test, la température d'hybridation est le paramètre qui a varié.

La tolérance de cycle a été évaluée en utilisant des standards synthétiques d'1 % à 3 niveaux différents d'ADN. Ces échantillons ont été analysés pour chaque mutation en triplicat avec des duplicats de standards mélangés et des simplicats de réactions NTC pour garantir le bon fonctionnement des tests conformément aux spécifications.

Chaque plaque a été testée à une température d'hybridation de 59 °C, 60 °C et 61 °C. 60 °C est la température optimale pour l'analyse du test, mais une variation entre les blocs PCR signifie que le test doit être robuste pour la plage donnée. Chaque plaque a été analysée en triplicat à chaque température. Les valeurs de Ct ont été obtenues grâce au logiciel LightCycler® Adapt Software et toutes les combinaisons des valeurs de Ct témoin et de mutation de chaque échantillon ont été utilisées pour calculer les valeurs ΔCt .

Tous les tests ont rempli le critère d'acceptation suivant lequel les valeurs à 59 °C et 61 °C ne doivent pas différer de la valeur moyenne à 60 °C \pm l'écart type à 60 °C. Cela montre que les tests sont suffisamment robustes pour supporter un écart d'1 °C dans la température d'hybridation.

ABI7500 : trois plaques PCR identiques contenant chacune 3 lots de réactifs du kit ont été analysées à chaque température d'hybridation. Le standard mélangé a été testé ainsi que 50 ng d'un pool d'ADN de lignée cellulaire présentant une mutation négative. Comme 60 °C est la température d'hybridation recommandée, les plaques ont été analysées à 58 °C, 60 °C et 62 °C.

Si les tests étaient suffisamment robustes pour supporter les températures expérimentales, les valeurs ΔCt de standard mélangé devaient être comprises à $\pm 1,5$ des valeurs définies pour le standard mélangé et les valeurs ΔCt du pool de lignées cellulaires devaient être supérieur aux points seuil d'1 %.

12ASP a montré la plus grande sensibilité aux variations de températures ; toutefois, tous les tests ont eu des résultats acceptables aux 3 températures, ce qui indique que les tests sont robustes lorsqu'ils sont effectués à des températures de 2 °C supérieures ou inférieures à la température optimale.

Validation de la tolérance à la *Taq* :

Instrument LightCycler® 480 : ces études ont déterminé la tolérance des tests de mutation pour les variations du niveau de la *Taq* polymérase, source potentielle de variation selon l'utilisation, puisqu'elle est ajoutée par l'utilisateur. La tolérance des tests à différents niveaux de *Taq* a été évaluée en utilisant 1 % de standards synthétiques à 3 niveaux différents d'ADN. Chaque échantillon a été testé en triplicat pour un niveau élevé, normal et faible de *Taq* (le niveau élevé est de 20 % de *Taq* en plus et le niveau faible est de 20 % de *Taq* en moins que le niveau normalement utilisé). Les duplicats de standards mélangés dupliqués et les simplicats de réactions NTC ont été analysés pour garantir le bon fonctionnement des tests conformément aux spécifications. Les analyses en triplicat ont été effectuées pour chaque plaque et 3 lots différents de *Taq* ont été testés.

Les valeurs de Ct ont été obtenues grâce au logiciel LightCycler® Adapt Software et toutes les combinaisons des valeurs de Ct de réplicats d'une plaque ont été utilisées pour calculer les valeurs ΔCt .

Tous les tests ont rempli le critère d'acceptation du fait que les échantillons de niveau élevé et de niveau faible de *Taq* ne différaient pas de la moyenne du niveau normal de *Taq* de plus d'1 écart type des données normales de *Taq*.



ABI7500 : trois plaques PCR identiques, contenant chacune 3 lots de réactifs, ont été analysées pour chaque test de mutation, la *Taq* polymérase variant à +10 % et -10 % de la quantité recommandée. La quantité recommandée a aussi été testée. Le standard mélangé a été testé tout comme 1 % des standards de 2 niveaux d'ADN et de 50 ng d'ADN de lignée cellulaire présentant une mutation négative. Les données du test ont été analysées pour la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation.

Les résultats ont montré une légère variation (écart type équivalent entre les tests, pourcentage de coefficient de variation < 10 %) dans les tests où le niveau de *Taq* variait de ± 10 %, ce qui montre que les tests pouvaient tolérer une variation des niveaux de *Taq* polymérase allant jusqu'à 10 %.

12. Assistance technique

Pour une assistance technique et d'autres informations, veuillez contacter votre distributeur Roche. Vous trouverez une liste de coordonnées des principaux distributeurs Roche dans la section 13.

13. Coordonnées des fabricants et distributeurs

	DxS Limited 48 Grafton Street, Manchester M13 9XX, Royaume-Uni		
 Distributed by	Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, 08876 USA Membre du groupe Roche		
ROYAUME-UNI	Roche Diagnostics Charles Avenue Burgess Hill, West Sussex, Royaume-Uni RH15 9RY	ALLEMAGNE	Roche Diagnostics GmbH Sandhoferstr. 116 Dept. VM-G Mannheim, D-68298,
FRANCE	Roche Diagnostics S.A. 2 Avenue du Vercors BP 59, Meylan Cedex, 38240	SUISSE	Roche Diagnostics (Schweiz) AG Industriestr. 7 Rotkreuz, CH-6343
ESPAGNE	Roche Diagnostics S.L. Av. de la Generalitat, s/n Sant Cugat del Valles Barcelona, E-08190	ITALIE	Roche Diagnostics – Italy V. le G.B. Stucchi 110 Monza (MI), I-20052

Si vous avez acheté ce kit dans un pays ne figurant pas dans la liste des distributeurs Roche Diagnostics ci-dessus, veuillez contacter Roche Diagnostics GmbH, à Mannheim, à l'adresse ci-dessous.

DISTRIBUTEUR PRINCIPAL	Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Strasse 116 D-68305 Mannheim
-------------------------------	---

14. Date de publication de la dernière révision

Date de la dernière version : janvier 2009

Résumé des changements : document en grande partie réécrit pour inclure les détails concernant l'utilisation avec le système de PCR en temps réel Roche LightCycler® 480 (Instrument II).

15. Références

1. R.A. Hilger, M.E. Scheulen, D. Strumberg. (2002). The Ras-Raf-MEK-ERK Pathway in the Treatment of Cancer. *Onkologie* 25: 511-518.
2. Pavan Bachireddy, Pavan K. Bendapudi, Dean W. Felsher. (2005). Getting at MYC through RAS. *Clin Cancer Res* 11(12):4278-4281.
3. Sae-Won Han, Tae-You Kim, Yoon Kyung Jeon, Pil Gyu Hwang, Seock-Ah Im, Kyung-Hun Lee, Jee Hyun Kim, Dong-Wan Kim, Dae Seog Heo, Noe Kyeong Kim, Doo Hyun Chung, Yung-Jue Bang. (2006). Optimization of Patient Selection for Gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer by combined analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation, K-ras Mutation, and AKT Phosphorylation. *Clin Cancer Res* 12(8):2538-2544.
4. William Pao, Theresa Y. Wang, Gregory J. Riely, Vincent A. Miller, Qiulu Pan, Marc Ladanyi, Maureen SF. Zakowski, Robert T. Heelan, Mark G. Kris, Harold E. Varmus. (2005). KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. *PLoS Medicine* 2(1):57-61.
5. Astrid Lievre, Jean-Baptiste Bachet, Delphine Le Corre, Valerie Boige, Bruno Landi, Jean-Francois Cote, Gorana Tomasic, Christophe Penna, Michel Ducreux, Philippe Rougier, Frederique Penault-Llorca, Pierre Laurent-Puig. (2006). KRAS Mutation Status is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 66 (8): 3992-3995.
6. Silvia Benvenuti, Andrea Sartore-Bianchi, Federica Di Nicolantonio, Carlo Zanon, Mauro Moroni, Silvio Veronese, Salvatore Siena, Alberto Bardelli. (2007). *Cancer Res* 67 (6): 2643-2648.
7. W. De Roock, J. De Schutter, G. De Hertogh, M. Janssens, B. Biesmans, N. Personeni, K. Geboes, C. Verslyp, E. Van Cutsem, S. Tejpar. (2007). *Journal of Clinical Oncology* 25 (18S): 4132.
8. G. Finocchiaro, F. Cappuzzo, P.A. Janne, K. Bencardino, C. Carnaghi, W.A. Franklin, M. Roncalli, L. Crino, A. Santoro, M. Varella-Garcia. (2007). *Journal of Clinical Oncology* 25 (18S): 4021.
9. F. Di Fiore, F. Blanchard, F. Charbonnier, F. Le Pessot, A. Lamy, M.P. Galais, L. Bastit, A. Killian, R. Sesboue, J.J. Tuech, A.M. Queuniet, B. Paillet, J.C. Sabourin, F. Michot, P. Michel, T. Frebourg (2007). *British Journal of Cancer* 96: 1166-1169.
10. Shirin Khambata-Ford, Christopher R. Garrett, Neal J. Meropol, Mark Basik, Christopher T. Harbison, Shujian Wu, Tai W. Wong, Xin Huang, Chris H. Takimoto, Andrew K. Godwin, Benjamin R. Tan, Smitha S. Krishnamurthi, Howard A. Burris III, Elizabeth A. Poplin, Manuel Hidalgo, Jose Baselga, Edwin A. Clark, David J. Mauro. (2007). *Journal of Clinical Oncology* 25(22): 3230-3237.
11. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C et al. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) *Nucleic Acids Res.* 17 (7): 2503-16.
12. Whitcombe, D., Theaker J., Guy, S.P., Brown, T., Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech* 17: 804-807.

13. Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J. and Brown, T. (2000). Mode of Action and Application of Scorpion Primers to Mutation Detection. *Nucleic Acids Research* 28(19): 3752-3761
14. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol.* 2007, Nov. 12.
15. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006;66:3992-5.
16. Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C, André T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 2008;26:374-9.
17. C. Bokemeyer et al., K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J Clin Oncol* 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 4000)
18. E. Van Cutsem et al., K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol* 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 2)
19. S. Tejpar et al., Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J Clin Oncol* 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 4001).
20. 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer: Abstract o-037. Presented June 27, 2008. "KRAS mutation status is a predictive biomarker for cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG CO.17: A phase III trial of cetuximab versus best supportive care". Christos Karapetis et al. Rafael G. Amado, Michael Wolf, Marc Peeters, Eric Van Cutsem, Salvatore Siena, Daniel J. Freeman, Todd Juan, Robert Sikorski, Sid Suggs, Robert Radinsky, Scott D. Patterson and David D, Chang. Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 1626-1634.

Remarques destinées à l'acquéreur :

Ce produit, TheraScreen® K-RAS Mutation Kit, ainsi que ses composants ne peuvent en aucun cas être revendus, transférés ou modifiés en vue d'une revente sans l'accord écrit de DxS Limited.

TheraScreen® et Scorpions® sont des marques déposées de DxS Limited. ARMS® est une marque déposée d'AstraZeneca UK Limited.

LIGHTCYCLER et ROCHE sont des marques commerciales de Roche.

ABI7500 est une marque commerciale d'Applied BioSystems.

Ce produit est un dispositif de diagnostic certifié CE, conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.

L'achat de ce produit confère à son acquéreur une licence limitée non transférable d'utilisation des technologies ARMS® et Scorpions® uniquement dans le cadre du diagnostic *in vitro*.

La technologie ARMS® est protégée par le brevet américain 5,595,890 et par le brevet EP 332435 ; la technologie Scorpions® est protégée par le brevet américain US patent 6,326,145 et par le brevet EP1088102.

Les informations de ce document sont susceptibles d'être modifiées. DxS Limited décline toute responsabilité pour toute éventuelle erreur apparaissant dans ce document. DxS Limited ne peut être tenu responsable en aucun cas et d'aucune façon (que ce soit d'un point de vue contractuel, délictuel (y compris par négligence) ou autre) pour toute revendication liée à l'utilisation de ce produit. Rien dans ce document n'exclurait ou ne limiterait une quelconque responsabilité si une telle limitation ou exclusion de la part de DxS s'avérait illégale.

© Copyright 2009. DxS Limited. Tous droits réservés.

DxS Limited,
48 Grafton Street,
Manchester,
M13 9XX
Royaume-Uni

www.dxsdiagnostics.com

