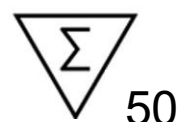


Janvier 2026

Urodiag PCR Kit Handbook



Version 6



A utiliser avec le système QuantStudio 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems_ThermoFisherScientific)



UR50N



OncoDiag
251 Rue Clément Ader
27000 Evreux
France



www.oncodiag.fr



Historique des révisions : Historique des révisions du manuel PCR Kit Handbook v5

Révision	Description
B	Changement des valeurs des intervalles de confiance du test de Mutation
A	Nouveau manuel d'utilisation Urodiag Handbook_v6_2026_FR

PRINCIPAUX CONSEILS POUR LE TEST URODIAG

Le test Urodiag est basé sur la détection simultanée des mutations et des méthylations.

1 - Prélèvement d'urine (80-100 ml)

- Le patient ne doit pas boire après 21 heures la veille du prélèvement d'urine.
- Le patient recueille les premières urines du matin (afin d'obtenir un grand nombre de cellules de la vessie).
- Le premier prélèvement d'urine doit être effectué **au moment du diagnostic (Référence ou Ref)**. L'échantillon doit être prélevé avant la cystoscopie confirmant le diagnostic de cancer du patient. Ce test initial donne le statut mutationnel du gène FGFR3 et une référence de méthylation (somme de la méthylation de 3 gènes) pour les tests suivants (T1, T2, ..., Tn).

Note : Nous recommandons aux patients de collecter l'échantillon d'urine (Réf) quelques jours avant la cystoscopie. Cela permettrait de demander un nouvel échantillon d'urine (Ref) si la quantité d'ADN est inférieure à 25 ng (exigence minimale). Il est possible de regrouper l'ADN des deux échantillons de Référence pour obtenir la quantité requise.

- À chaque test de suivi (T1, T2, ...Tn), un échantillon d'urine est prélevé. Le test donne le statut du suivi en fonction des mutations (positives ou négatives), le pourcentage de méthylation de 3 gènes et le SCORE de méthylation, lequel est calculé en prenant en compte le pourcentage de méthylation au temps Réf et celui obtenu à Tn).

2 - Quantité d'ADN nécessaire

Le test Urodiag nécessite une quantité de **25 à 40 ng d'ADN (Ref ou Tn)**.

- Le test de mutation nécessite **10 ng d'ADN**
- Le test de méthylation nécessite **15 à 30 ng d'ADN (30 ng sont recommandés)**.
 - Si la concentration d'ADN est **supérieure à 1,25 ng/μl**, elle doit être diluée avec un tampon d'élution (l'ADN restant est conservé à -20 °C).
 - Si la concentration en ADN est **inférieure à 1,25 ng/μl**, il faut le concentrer en le chauffant à +50°C à l'aide d'un bloc chauffant ou d'un concentrateur d'ADN (speed vacuum). Le volume d'ADN à évaporer est calculé pour obtenir une concentration proche de 1,25 ng/μl.

3 – Résultat du test Urodiag

Le logiciel Urodiag fournit des résultats de tests basés sur les données obtenues au diagnostic initial de NMIBC (Ref) et à chaque point de suivi en mois (Tn).

Test de Mutation à Tn		Methylation SCORE	Résultat
Positif	et	≥ -0.021	POSITIF
Positif	et	< -0.021	POSITIF
Négatif	et	≥ -0.021	POSITIF
Négatif	et	< -0.021	NEGATIF

Le test de Mutation est positif si au moins une des quatre mutations a été détectée.

Le SCORE de Méthylation est déterminé par une équation qui prend en compte la somme des pourcentages de méthylation calculée au moment du diagnostic initial (SUM_Ref) et à chaque point de suivi Tn pour le patient (SUM_Tn).

Le Résultat est POSITIF = Présence d'une récurrence du cancer de la vessie.

Le Résultat est NEGATIF = Absence d'une récurrence du cancer de la vessie.

Table des matières

Utilisation Prévue.....	5
Principe de la Procédure	5
Matériels Fournis	5
Matériels Requis mais Non Fournis	6
Protocole de Recueil des Urines	7
Protocole de Filtration des Echantillons d'Urine	8
Protocole d'Extraction et de Purification d'ADN.....	9
Protocole de Conversion de l'ADN par le Bisulfite de Sodium.....	11
Protocole de PCR Multiplexe.....	13
Rendu du Test Urodiag	19
Performances Cliniques	21
Caractéristiques de Performance	21
Mise au rebut et gestion des déchets	22

Utilisation Prévue

Le kit PCR Urodiag est un test urinaire de diagnostic in vitro pour la détection précoce des récurrences de cancer de la vessie non invasif sur le plan musculaire (TVNIM). Il s'agit d'un kit prêt à l'emploi pour la détection de quatre mutations somatiques dans le gène FGFR3 et la quantification du pourcentage de méthylation de trois gènes par réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (PCR). Le résultat du test Urodiag est obtenu sur les urines recueillies au **moment du diagnostic (Ref)** et celles recueillies à chaque **point de suivi (Tn) en mois**. Le test Urodiag offre une sensibilité et une spécificité élevées, même chez les patients à faible risque de récurrence.

Liste des mutations du gène FGFR3

Mutation	G372C	R248C	S249C	Y375C
Base mutée	GGC > TGC	CGC > TGC	TCC > TGC	TAT > TGT

Liste des gènes méthylés

SEPTINE9	HS3ST2	SLIT2
----------	--------	-------

Principe de la Procédure

Le kit PCR Urodiag utilise la chimie TaqMan MGB (minor groove binder) pour les tests de mutation et de méthylation.

Sonde TaqMan MGB

Elle repose sur l'utilisation d'une sonde oligonucléotidique située entre les deux amorces PCR et marquée par un fluorophore fixé de manière covalente à l'extrémité 5' (reporter) et un quencher à l'extrémité 3'. L'ajout à la sonde d'un groupement MGB inclusif augmente considérablement la stabilité et la spécificité de l'hybridation de la sonde, et l'utilisation d'un NFQ (Non-fluorescent quenched) améliore les performances spectrales. Le quencher ne produisant pas de fluorescence, le bruit de fond est éliminé et le rapport signal/bruit est augmenté. La fluorescence détectée dans le thermocycleur PCR en temps réel est directement proportionnelle au fluorophore libéré et à la quantité de matrice d'ADN présente dans la PCR.

Format du kit

Le kit PCR Urodiag est conçu pour réaliser 50 tests. Il comprend deux boîtes avec une boîte de 50 filtres pour la filtration de l'urine et une boîte pour réaliser 50 tests de PCR. Le kit est composé de 8 tubes : cinq tubes pour le test de mutation (bleu, vert et blanc) et trois tubes pour le test de méthylation (rouge, orange et violet). Chaque tube contient tous les composants nécessaires pour effectuer les tests de mutation et de méthylation.

Matériels Fournis

Urodiag Urine Filters	
Nombre de filters	50
▪ 50 filtres pour seringue à usage unique ▪ Filtres conservés à 20°C ± 5°C ▪ Durée de péremption : 10 ans à compter de la date de la production.	

Urodiag Multiplex PCR Kit				
Nombre de tests				50
Test de Mutation				
REF 1	Master Mix mut 1 (MM mut 1)	S249C + Y375C + GLOBINE	Bleu	960 µl
REF 2	Contrôle Positif mut 1 (C+ mut 1)	S249C + Y375C + GLOBINE	Bleu	22 µl
REF 3	Master Mix mut 2 (MM mut 2)	R248C + G372C + GLOBINE	Vert	960 µl
REF 4	Contrôle Positif mut 2 (C+ mut 2)	R248C + G372C + GLOBINE	Vert	22 µl
REF 5	Contrôle négatif mut (C- mut)	GLOBINE	Jaune	44 µl
Test de Méthylation				
REF 6	Master Mix meth A (MM meth A)	ALBUMINE + SEPTINE9	Rouge	960 µl
REF 7	Master Mix meth B (MM meth B)	HS3ST2 + SLIT2	Orange	960 µl
REF 8	Contrôle Positif meth (C+ meth)	ADN méthylé	Violet	126 µl
Le kit doit être conservé dès réception entre -15°C et -30°C dans un congélateur à température constante et à l'abri de la lumière.				
Date de péremption : 12 mois à compter de la date de la production				

Logiciel Urodiag

Le logiciel permet l'analyse des données PCR, l'interprétation, la gestion des résultats et le rendu du test Urodiag aux urologues.

Matériels Requis mais Non Fournis

Réactifs

- Extraction d'ADN utilisant le kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), catalogue Nos. 51304 (50 rns) (voir "Protocole d'Extraction et de Purification d'ADN", page 7)
- Conversion de l'ADN par Bisulfite de Sodium utilisant le kit EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research), catalogue No. D5001 (55 réactions) (voir "Protocole de Conversion de l'ADN par le Bisulfite de sodium", page 9)
- Tubes de dosage Qubit, reference Q32851 (100), Q32856 (500) (Thermo Fisher Scientific) ou équivalent

Equipement

- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems_ThermoFisherScientific)
- QuantStudio 5 software v1.6.1
- Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) ou équivalent

Protocole de Recueil des Urines



RECOMMANDATIONS

- Ne pas boire après 21 h la veille au soir du prélèvement des urines
- Recueillir les premières urines du matin



- **Les urines Ref** sont recueillies **AVANT** que l'examen cystoscopique soit réalisé pour confirmer le cancer de la vessie (TVNIM).

Il est fortement recommandé de recueillir l'échantillon d'urine une semaine avant la cystoscopie. Cela permettrait de demander un nouvel échantillon d'urine Ref dans le cas où la quantité d'ADN est inférieure à 25 ng (minimum requis).

INSTRUCTIONS DE RECUEIL

Effectuer sur FLACON STERILE

- Se laver soigneusement les mains au savon
- Faire une toilette soignée locale
- Eliminer le 1^{er} jet urinaire dans les toilettes
- Recueillir **80 ml à 100 ml (recommandé) des urines** dans le flacon stérile
- Refermer le flacon en vissant correctement le couvercle et l'identifier (nom + prénom + date et heure du prélèvement)

Délai de conservation du prélèvement

- Acheminement du pot d'urine, du domicile du patient au service compétent (Laboratoire, hôpital) à température ambiante et dans le délai de 2 heures,
- Au delà de 2 heures, conserver l'urine au réfrigérateur (+4°C à +8°C) jusqu'à 72 heures maximum

Protocole de Filtration des Echantillons d'Urine

Urodiag Urine Filter

50 Filtres



Protocole

- Filtres Urodiag : Les Filtres Urodiag sont à usage unique. Ils sont conservés à température du laboratoire (15°C-25°C).
- Durée de péremption : 10 ans à compter de la date de la production.

Equipement et réactifs à fournir par l'utilisateur :

- Echantillons urinaires **Ref** et **Tn** compris entre **80 ml et 100 ml**
- Seringue 50-100 ml luer-lock (Terumo)
- Solution de 1X PBS (Phosphate-buffered saline, sans Mg & Ca) conservée à +4°C
- Flacon à déchets contenant de l'eau de Javel

1. Retirer le piston de la seringue et connecter le **Filtre (Ref ou Tn)** à la seringue
2. Introduire l'**échantillon d'urine (Ref ou Tn)** dans la seringue et réinsérer le piston dans la seringue
3. Appliquer une légère pression sur le piston pour assurer la filtration de l'échantillon d'urine. Le filtrat est collecté dans un conteneur à déchets contenant de l'eau de Javel



Si vous utilisez une seringue de 50 ml, l'opérateur devra déconnecter le filtre (Ref ou Tn) de la seringue après la filtration des premiers 50 ml d'urine et répéter les étapes 1 à 3 pour filtrer le volume restant de l'échantillon.

4. Retirer le piston de la seringue et connecter le **Filtre (Ref ou Tn)** à la seringue.
5. Introduire **5 ml de 1X PBS** dans la seringue et réinsérer le piston dans la seringue.
6. Appliquer une légère pression sur le piston pour **assurer la filtration totale des 5 ml de 1X PBS**. Le filtrat est collecté dans un conteneur à déchets contenant de l'eau de Javel.
7. Déconnecter le **Filtre (Ref ou Tn)** de la seringue.
8. **Le Filtre (Ref ou Tn) est prêt immédiatement pour la procédure d'extraction d'ADN ou peut être conservé un mois à -20°C et pouvant être expédié congeler en carboglace.**

Note: Protocole alternatif de filtration utilisant le QIAvac 24 Plus (Qiagen). Allumer la pompe à vide en appuyant sur l'interrupteur d'alimentation. Réglez l'aiguille du vide entre -250 mbar et -300 mbar. Connecter le dispositif VacConnector et Filtre/seringue (sans le piston) sur le QIAvac 24 Plus. Introduire l'échantillon d'urine dans la seringue. Ouvrez la soupape de dépression principale et assurez-vous que l'aiguille est stabilisée à -300 mbar. Une fois que tout l'échantillon d'urine a été filtré, éteindre la pompe à vide. Retirez le dispositif Filtre/seringue du QIAvac et jeter le VacConnector.

Protocole d'Extraction et de Purification d'ADN

Protocole

L'extraction et la purification de l'ADN sont réalisées avec le **kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN)**. Les composants du kit sont conservés à température du laboratoire (+15°C à +25°C).

Durée de péremption : 12 mois à compter de la date de la livraison.

Equipement et réactifs à fournir par l'utilisateur :

- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), Catalog Nos. 51304 (50 rns) pour la commande du Kit UR50K
- Ethanol absolu (96-100%) (conservé +4°C)
- Seringue 2.5 ml avec aiguille de 21 Gauge (Terumo)
- Micropipettes et pointes stériles avec filtre
- Microcentrifugeuse avec rotor pour microtubes de 1,5-2 ml
- Vortex
- Bain-marie ou bloc chauffant
- Tampon PBS 1X (Phosphate-buffered saline, sans Mg & Ca) (conservé à +4°C)
- Eau stérile de qualité PCR (conservée à +4°C)

Préparation des solutions :

Préparation des solutions de lavage (flacons Wash Buffer- AW1 et AW2) - Additionner le volume d'éthanol comme indiqué sur le flacon. Les solutions AW1 et AW2 sont stables pendant 12 mois à température du laboratoire (15°C à 25°C).

Préparation de la solution de lyse cellulaire

1. Introduire 220 µl de tampon **PBS 1X** et 22 µl de **Protéinase K** dans un microtube de 1,5 ml.
2. Mélanger au vortex pendant 1 seconde et centrifuger brièvement le tube pendant 2 secondes.
3. Additionner 220 µl du tampon **Buffer AL**. Mélanger au vortex pendant 2-5 secondes et centrifuger brièvement le tube pendant 2 secondes.

Note: *Bien mélanger le tampon Buffer AL avant utilisation. Ne pas ajouter la Protéinase K directement dans le tampon Buffer AL.*

4. Déconnecter l'aiguille et le piston de la seringue.
5. Connecter le **Filtre (Ref ou Tn)** (Filtre récupéré après la filtration de l'urine) à la seringue, puis l'aiguille, et placer le dispositif dans un microtube de 2 ml.

Note: *Si le Filtre (Ref ou Tn) a été conservé à -20°C, laissez-le sur la paillasse 5 min à température ambiante avant l'étape de lyse*

6. Introduire 462 µl de la **solution de lyse cellulaire** à l'intérieur de la seringue, puis réinsérer le piston.

7. Faire passer le lysat 3 fois à travers le **Filtre (Ref ou Tn)** par une opération d'aspiration / refoulement en poussant/tirant lentement le piston.

Note : *En cas de formation de mousse, il est recommandé de centrifuger brièvement le tube pendant 2 secondes.*

8. Incuber l'échantillon à 56°C pendant 15 minutes (bain-marie ou bloc chauffant).
9. Centrifuger brièvement l'échantillon d'ADN (**Ref** ou **Tn**) pendant 2 secondes pour retirer les gouttes du couvercle ou des côtés du tube.
10. Additionner 220 µl d'**Ethanol absolu** à l'échantillon et vortexer 2 secondes. Centrifuger brièvement l'échantillon d'ADN (**Ref** ou **Tn**) pendant 2 secondes pour retirer les gouttes du couvercle ou des côtés du tube.
11. Introduire l'échantillon (682 µl) à l'intérieur de la colonne **QIAamp Mini spin column** munie d'un **tube collecteur**. Fermer la colonne, et centrifuger à vitesse maximale (14,000 rpm, $\geq 10,000 \times g$) pendant 1 min. Jeter le filtrat et le tube collecteur.
12. Placer la colonne QIAamp Mini spin column dans un nouveau tube collecteur et introduire 500 µl de la solution de lavage **Buffer AW1**. Fermer la colonne, et centrifuger à vitesse maximale (14,000 rpm, $\geq 10,000 \times g$) pendant 1 min. Jeter le filtrat et le tube collecteur.
13. Placer la colonne QIAamp Mini spin column dans un nouveau tube collecteur et introduire 500 µl de la solution de lavage **Buffer AW2**. Fermer la colonne, et centrifuger à vitesse maximale (14,000 rpm, $\geq 10,000 \times g$) pendant 3 min. Jeter le filtrat et le tube collecteur.
14. Placer la colonne dans un microtube de 1,5 ml et centrifuger à la vitesse maximale pendant 1 min pour retirer par pipetage les traces éventuelles de la solution de lavage Buffer AW2.
15. Introduire 50 µl de la solution d'élution **Buffer AE** au centre de la colonne (contact avec la matrice), et laisser en contact 5 minutes à 20-30°C. Centrifuger le microtube à la vitesse maximale pendant 1 min pour éluer la solution d'ADN (**Ref** ou **Tn**).
16. Déterminer la concentration d'ADN (**Ref** ou **Tn**) par fluorométrie (par exemple : Qubit Fluorometer_Thermo Fisher Scientific-Invitrogen).
17. La solution d'ADN (**Ref** ou **Tn**) est prête à l'emploi ou peut être conservée un mois à -20°C. Avant d'effectuer les tests de mutation et de méthylation, **25 à 40 ng d'ADN (Ref ou Tn) doivent être dilués à la concentration de 1,25 ng/µl avec le Buffer AE** (Le reliquat d'ADN est conservé à -20°C).

Note: le test Urodiag requiert une quantité d'ADN (Ref ou Tn) comprise entre 25 ng et 40 ng

- **le test de Mutation** requiert une quantité d'ADN de **10 ng**.
- **Le test de Méthylation** requiert une quantité d'ADN comprise entre **15 ng et 30 ng (quantité recommandée)**

Si la solution d'ADN est inférieure à 1,25 ng/µl, elle doit être concentrée en la chauffant à la température de +50°C à l'aide d'un bloc chauffant ou d'un concentrateur d'ADN (speed vacuum). Le volume d'ADN à évaporer est calculé pour obtenir une concentration proche de 1,25 ng/µl.

Protocole de Conversion de l'ADN par le Bisulfite de Sodium

Protocole

La conversion au bisulfite de l'ADN est réalisée avec l'EZ DNA Modification Kit (Zymo Research). Le kit peut être conservé à la température du laboratoire (+15°C à +25°C).

Date de péremption : 12 mois minimum à compter de la date de la livraison.

Equipement et réactifs à fournir par l'utilisateur :

- EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research), No. D5001 (55 réactions.) (Inclus pour réf. UR50K)
- Ethanol absolu (96-100%)
- Microtubes 1,5 ml et tubes PCR 0,2 ml (barrette de 8 tubes, No. N8010580, ThermoFischer Scientific) avec capuchons (barrette de 8, No. N8010535, ThermoFisher Scientific)
- Micropipettes et pointes stériles avec filtre
- Microcentrifugeuse (avec rotor pour microtubes de 1,5-2 ml)
- Vortex
- Incubateur à +37°C en bloc chauffant
- Incubateur à +50°C en thermocycler (recommandé) ou en bloc chauffant
- Eau, PCR grade (conservée à +4°C)

Préparation des solutions:

1. **Préparation de la solution de conversion (Tube CT-Conversion) pour 11 réactions** - Le tube **CT Conversion** est un mélange solide. La solution de conversion doit être préparée comme suit :

- Introduire 750 µl d'eau de qualité PCR et 210 µl de la solution **M-Dilution Buffer** dans le tube **CT-Conversion**.
- Vortexer le tube en agitant fréquemment pendant 10 minutes à température du laboratoire.

Note : Possibilité d'avoir des traces de paillettes non dissoutes. La solution de CT-Conversion peut être utilisée immédiatement (recommandé) ou conservée une semaine à 4°C et un mois à -20°C.

2. **Préparation de la solution M-Wash Buffer** – Ajouter 24 ml d'éthanol absolu dans le flacon de 6 ml de **M-Wash Buffer concentré**.

3. **Préparation des solutions d'ADN**. Introduire dans un microtube de 1,5 ml les différents volumes indiqués dans le tableau ci-dessous. Le volume réactionnel est de 50 µl.

A chaque expérience (run)	C+ meth (cap. violet)* (1,25 ng/µl)	Patient (Ref ou Tn) (1,25 ng/µl)	
Echantillon d'ADN	24 µl (30 ng)	24 µl (30 ng)	12 µl à 23 µl (15 ng à 28.75 ng)
Eau, PCR grade	21 µl	21 µl	Ajuster le volume à 45 µl
M-Dilution Buffer	5 µl	5 µl	5 µl
Homogénéiser l'échantillon (50 µl) par pipetage-refoulement			

***Tube C+ meth de l'Urodiag Multiplex PCR Kit (capuchon violet)** = ADN de contrôle 100% méthylé, No. ZD5011 (Zymo Research)

4. Incuber en bloc chauffant l'échantillon d'ADN pendant 15 minutes à +37°C.
5. Centrifuger brièvement l'échantillon d'ADN pendant 2 secondes pour retirer les gouttes du couvercle ou des côtés du tube.
6. Additionner 100 µl de la solution de conversion à l'échantillon d'ADN (50 µl) et homogénéiser par « pipetage-refoulement » 5 fois.
7. Transférer l'échantillon d'ADN (150 µl) contenu dans le microtube de 1.5 ml dans un tube PCR de 0.2 ml (par exemple, barrette de 8 MicroAmp tubes et barrette de 8 capuchons, applied biosystems).
8. Incuber l'échantillon d'ADN dans un thermocycler pendant 15h30 à 50°C puis « hold » à +4°C.
9. Le tube peut être conservé à +4°C pendant 10 minutes à 20 heures.

Note : Condition d'incubation alternative. Etape 6 : l'échantillon d'ADN (150 µl) contenu dans le microtube de 1.5 ml est incubé dans un bloc chauffant à 50°C pendant 15 h30, puis conservé à +4°C pendant 10 minutes à 20 heures.

10. Introduire 400 µl de la solution **M-Binding Buffer** dans la colonne **Zymo-Spin IC Column** munie d'un **tube collecteur**.
11. Additionner l'échantillon (~150 µl) dans la colonne Zymo-Spin IC contenant le tampon M-Binding Buffer. Fermer la colonne et homogénéiser le mélange par retournement de la colonne au moins 5 fois.
12. Centrifuger la colonne à vitesse maximale (14,000 rpm, $\geq 10,000 \times g$) pendant 30 secondes. Jeter le filtrat.
13. Introduire 100 µl de la solution **M-Wash Buffer** dans la colonne. Fermer la colonne et centrifuger à vitesse maximale (14,000 rpm, $\geq 10,000 \times g$) pendant 30 secondes.
14. Introduire 200 µl de la solution **M-Desulphonation Buffer** dans la colonne et laisser en contact 20 minutes à température du laboratoire. Centrifuger la colonne à vitesse maximale (14,000 rpm, $\geq 10,000 \times g$) pendant 30 secondes.
15. Introduire 200 µl de la solution **M-Wash Buffer** dans la colonne. Fermer la colonne et centrifuger à la vitesse maximale pendant 30 secondes. Répéter l'étape de lavage une nouvelle fois.
16. Placer la colonne dans un microtube de 1,5 ml et centrifuger à la vitesse maximale pendant 30 secondes pour retirer par pipetage les traces éventuelles de M-Wash Buffer.
17. Introduire **10 µl de la solution M-Elution Buffer** au centre de la colonne (contact avec la matrice), et laisser en contact 5 minutes à la température du laboratoire. Centrifuger le microtube à la vitesse maximale (14,000 rpm, $\geq 10,000 \times g$) pendant 30 secondes pour éluer l'ADN traité au bisulfite.

La solution d'ADN convertie au bisulfite de sodium est prête immédiatement pour l'analyse de méthylation ou peut être conservée une semaine à -20°C.

Protocole de PCR Multiplexe

Urodiag Multiplex PCR Kit

Le kit Urodiag Multiplex PCR est un test de diagnostic in vitro destiné à la surveillance des patients atteints d'une tumeur de la vessie non infiltrant le muscle (TVNIM).

La procédure pour les réactions de PCR multiplex est réalisée avec le système QuantStudio 5 Real-Time PCR (applied biosystems, ThermoFisher Scientific). Le kit peut être conservé au congélateur à la température comprise entre -15°C et -30°C pendant une durée maximale de 12 mois. Il n'est pas recommandé de congeler et décongeler le kit plus de 5 fois.

Date de péremption : 12 mois à compter de la date de la production.

Equipement et réactifs à fournir par l'utilisateur

- QuantStudio 5 Real-Time system (ThermoFisher Scientific)
- MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, 0.2 ml, Catalog No. N8010560 (ThermoFisher Scientific) et Optical Adhesive Covers, Catalog No. 4360954 (ThermoFisher Scientific) ou MicroAmp Optical 8-Tube Strip, 0.2 ml, Catalog No. 4316567 (ThermoFisher Scientific) et MicroAmp Optical 8-Cap Strip, Catalog No. 4323032 (ThermoFisher Scientific) ou MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 ml, No. 4346907 ou MicroAmp Fast Reaction Tubes, 0,1 ml (8 tubes/strip), No. 4358293 (ThermoFisher Scientific).
- Micropipettes et pointes stériles avec filtre
- Microcentrifugeuse pour plaque PCR
- Vortex
- Bloc de refroidissement
- Eau stérile de qualité PCR

Contenu du kit

Le kit est conçu pour 50 tests de patients. Il est fourni pour un total de 240 réactions de PCR (5 runs PCR au maximum avec 10 patients max / run). Chaque run PCR comprend 48 réactions, incluant 8 contrôles et 40 PCR pour 10 patients.

Il est destiné à la détection de 4 mutations du gène *FGFR3* (G372C, R248C, S249C, Y375C) et à la quantification de 3 marqueurs de méthylation de l'ADN (HS3ST2, SEPTIN9, SLIT2) par PCR multiplex à partir d'ADN urinaire des patients.

Le kit est composé de 8 tubes : 5 tubes pour le test de mutation (capuchon bleu, vert et Jaune), 3 tubes pour le test de méthylation (capuchon rouge, orange et violet). Chaque tube contient tous les composants nécessaires pour effectuer les tests de mutation et de méthylation.



	Capuchon	Etiquette	Description
Test de Mutation		MM mut 1 Lot 0000X Exp. Store at: -15 to -30°C Light sensitive Vol. 960 µL	Master Mix mutation1 : Le tube contient tous les composants (PCR master mix, amorces et sondes) nécessaires pour détecter les mutations S249C, Y375C et le gène de la GLOBINE (contrôle interne)
		C+ mut 1 Lot 0000X Exp. Store at: -15 to -30°C Vol. 22 µL	Contrôle Positif mutation 1 : Plasmide (P1) insérant un ADN synthétique pour la détection du gène de la GLOBINE (contrôle interne) et les mutations S249C et Y375C du gène FGFR3
		MM mut 2 Lot 0000X Exp. Store at: -15 to -30°C Light sensitive Vol. 960 µL	Master Mix mutation 2 : Le tube contient tous les composants (PCR master mix, amorces et sondes) nécessaires pour détecter les mutations G372C, R248C et le gène de la GLOBINE (contrôle interne)
		C+ mut 2 Lot 0000X Exp. Store at: -15 to -30°C Vol. 22 µL	Contrôle Positif mutation 2 : Plasmide (P2) insérant un ADN synthétique pour la détection du gène de la GLOBINE (contrôle interne) et les mutations G372C et R248C du gène FGFR3
		C- mut Lot 0000X Exp. Store at: -15 to -30°C Vol. 44 µL	Contrôle Négatif mutation : ADN humain pour détecter le gène de la GLOBINE
Test de Méthylation		MM meth A Lot 0000X Exp. Store at: -15 to -30°C Light sensitive Vol. 960 µL	Master Mix méthylation A : Le tube contient tous les composants (PCR master mix, amorces et sondes) nécessaires pour détecter et quantifier les gènes ALBUMINE (non méthylé) et SEPTINE9 (allèle méthylé)
		MM meth B Lot 0000X Exp. Store at: -15 to -30°C Light sensitive Vol. 960 µL	Master Mix méthylation B : Le tube contient tous les composants (PCR master mix, amorces et sondes) nécessaires pour détecter et quantifier les gènes HS3ST2 et SLIT2 (allèles méthylés)
		C+ meth Lot 0000X Exp. Store at: -15 to -30°C Vol. 126 µL	Contrôle Positif méthylation : ADN de contrôle 100% méthylé (humain). <u>La solution d'ADN est convertie au bisulfite de sodium avant utilisation.</u>

Protocole

Etape 1 : Préparation du mélange réactionnel pour la PCR

1. Décongeler les tubes dans un bloc réfrigérant (recommandé),
2. Lorsque les réactifs sont décongelés, mélanger en inversant 10 fois chaque tube de mélange maître (MM mut 1, MM mut 2, MM meth A et MM meth B) et mélanger en tapotant les tubes d'ADN de contrôle (C+ mut 1, C+ mut 2, C- mut et C+ meth converti au bisulfite) et les tubes d'ADN de patient converti au bisulfite.
3. Centrifuger brièvement pour recueillir les solutions au fond du tube.

• Test de Mutation

Le test de mutation doit être réalisé avec **10 ng d'ADN (Ref ou Tn)**, dont 5 ng d'ADN pour la détection des mutations S249C et Y375C et 5 ng d'ADN pour la détection des mutations G372C et R248C.

Préparer les échantillons conformément au tableau 1 ci-dessous.

Tube	Contrôle				Patient (Ref ou Tn)	
	Contrôle 1		Contrôle 2		Test 1	Test 2
	Positif	Négatif	Positif	Négatif		
MM mut 1	16 µl	16 µl	/	/	16 µl	/
C+ mut 1	4 µl	/	/	/	/	/
MM mut 2	/	/	16 µl	16 µl	/	16 µl
C+ mut 2	/	/	4 µl	/	/	/
C- mut	/	4 µl	/	4 µl	/	/
ADN patient (Ref ou Tn) (1,25 ng/µl)	/	/	/	/	4 µl	4 µl
Volume final	20 µl					

• Test de Méthylation

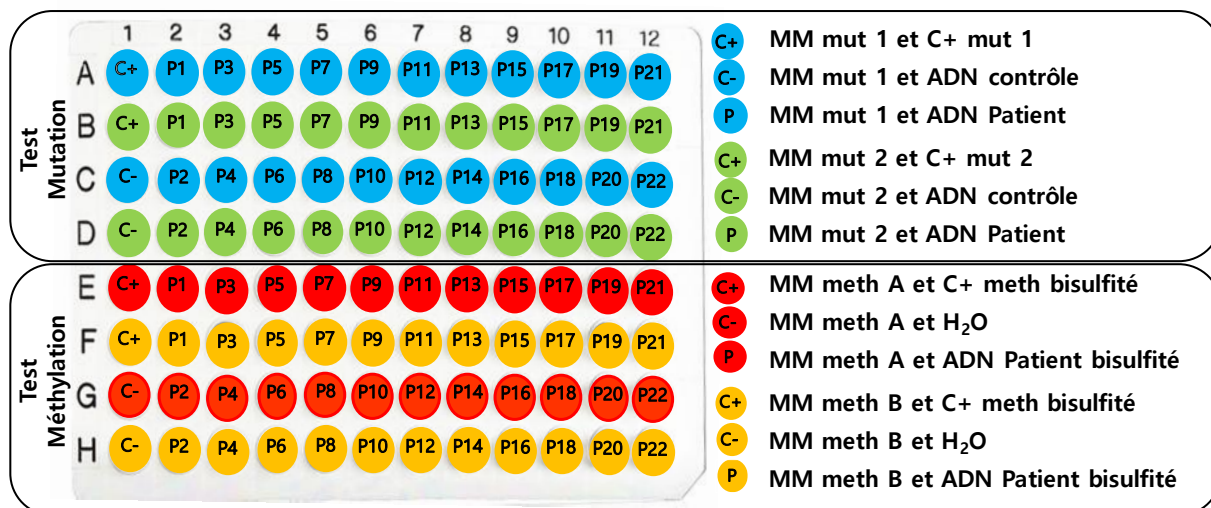
Préparer les échantillons conformément aux recommandations du Tableau 2 ci-dessous.

Tube	Contrôle				Patient (Ref ou Tn)	
	Contrôle 1		Contrôle 2		Test 1	Test 2
	Positive	Negative	Positive	Negative		
MM meth A	16 µl	16 µl	/	/	16 µl	/
MM meth B	/	/	16 µl	16 µl	/	16 µl
C+ meth (30 ng) converti au bisulfite de sodium	4 µl	/	4 µl	/	/	/
ADN patient (Ref ou Tn) (15 à 30 ng) converti au bisulfite de sodium	/	/	/	/	4 µl	4 µl
Eau, PCR grade	/	4 µl	/	4 µl	/	/
Final volume	20 µl					

Etape 2: Dépôt des échantillons dans une plaque 96 puits MicroAmp Fast Optical ou MicroAmp Fast Reaction (8 tubes / bandelette)

Ci-dessous, il est représenté le plan du dépôt des échantillons en plaque PCR 96 puits (ou en barrette de 8 tubes 0.1 ml ou 0.2 ml) pour analyser 22 patients (**Ref** ou **Tn**).

1- Distribuer les volumes appropriés (réactifs/échantillons) dans les puits ou tubes correspondants (cf. Tableaux 1 et 2),



2- Recouvrir la plaque 96 puits avec le film optique ou fermer les tubes PCR avec les capuchons de qualité optique,

3- Centrifuger la plaque PCR 96 puits ou les tubes PCR à l'aide d'un rotor de microplaque pendant 10 secondes à environ 1000 x g (3000 rpm) pour collecter les volumes réactionnels au fond des puits et éliminer les bulles d'air.

Etape 3 : Programmation du QuantStudio 5 Real-Time system

La configuration de la réaction PCR est enregistrée dans le fichier QS5_BLOCK 0.1 ml_QUANTINOVA.edt et le fichier QS5_BLOCK 0.2 ml_QUANTINOVA.edt. L'opérateur devra importer le fichier dans le QuantStudio 5. Placer la plaque PCR 96 puits ou les tubes PCR dans la machine PCR et démarrer le programme de PCR en sélectionnant la touche RUN.

Paramètres

Test de Mutation		
Réactifs Taqman (TaqMan reagents)		
Mode Quantitation –Comparative Ct		
Volume par puits (Reaction volume per well)		20 µl
Vitesse rampe (Ramp speed)		Fast
Taux de rampe (Ramp rate)		100%
Seuil de positivité ou R248C	0.190	
Threshold (ΔRn)	G372C	0.100
	S249C	0.045
	Y375C	0.080
	GLOBINE	0.100
Baseline		Auto
Référence passive (Passive reference)		ROX

Test de Méthylation		
Réactifs TaqMan (TaqMan reagents)		
Mode Quantitation –Comparative Ct		
Volume par puits (Reaction volume per well)		20 µl
Vitesse rampe (Ramp speed)		Fast
Taux de rampe (Ramp rate)		100%
Seuil de positivité ou ALBUMINE	0.10	
Threshold (ΔRn)	HS3ST2	0.10
	SEPTINE9	0.10
	SLIT2	0.10
Baseline		Auto
Référence passive (Passive reference)		ROX

▪ **Fluorophore (Reporter)**

Test de Mutation		
Détection	Reporter	Quencher
G372C	VIC	(aucun)
R248C	FAM	(aucun)
S249C	FAM	(aucun)
Y375C	VIC	(aucun)
GLOBINE	NED	(aucun)

Test de Méthylation		
Détection	Reporter	Quencher
ALBUMINE	VIC	(aucun)
HS3ST2	FAM	(aucun)
SEPTINE9	FAM	(aucun)
SLIT2	VIC	(aucun)

▪ **Conditions de la PCR multiplex**

Etapes	Nombre de cycles	Time	Température	Collecte de données de fluorescence
Activation initiale de la PCR (hot start)	1	3:00 min	95°C	-
Dénaturation	40	00:05 min	95°C	-
Hybridation/extension		00:30 min	60°C	✓

Etape 4: Rendu des résultats

Des intervalles de confiance (valeurs Cts min et max) ainsi que des seuils de positivité (threshold) (ΔRn) ont été fixés pour une précision optimale du test Urodiag en termes de sensibilité et de spécificité.

▪ **Contrôle Qualité (CQ)**

Test de Mutation			Valeurs Ct		Rendu
			Min	Max	
Contrôle	Positif	GLOBINE	27	33	PASSE
		Mutations FGFR3 : G372C, R248C, S249C et Y375C	27	34	PASSE
	Négatif	GLOBINE	27	33	PASSE
		Mutations FGFR3 : G372C, R248C, S249C et Y375C	Pas d'amplification		PASSE
Patient (Ref ou Tn)	Positif	GLOBINE	27	33	PASSE

Test de Méthylation			Valeurs Ct		Rendu
			Min	Max	
Contrôle	Positif	ALBUMINE, HS3ST2, SEPTINE9 et SLIT2	26	32	PASSE
	Négatif	ALBUMINE, HS3ST2, SEPTINE9 et SLIT2	Pas d'amplification		PASSE
Patient (Ref ou Tn)	Positif	ALBUMINE	26	32	PASSE

▪ Patient (T0 ou Tn)

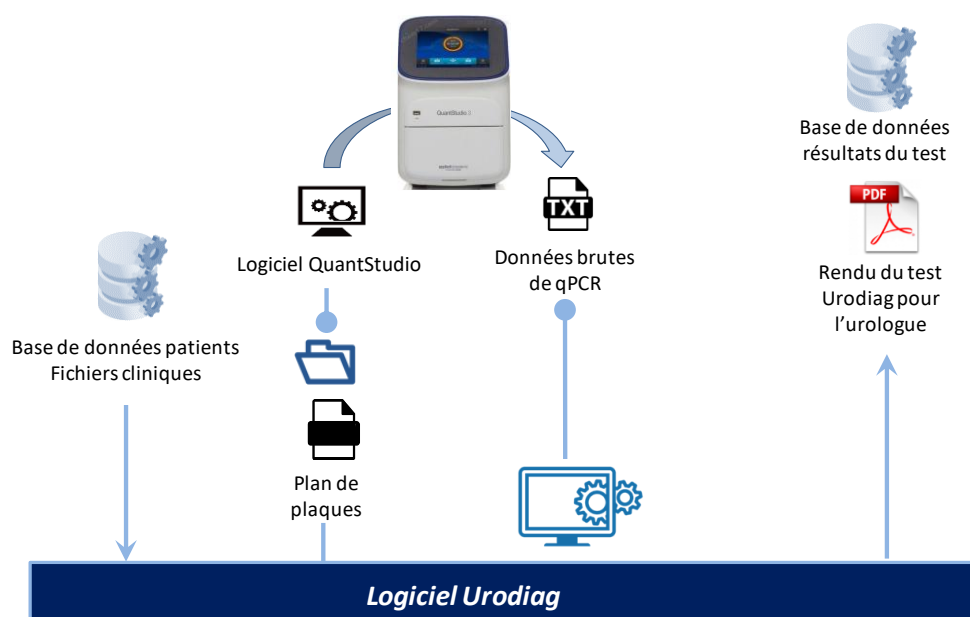
Test de Mutation		Valeurs Ct		Interprétation	Résultat
		Min	Max		
Patient (Ref ou Tn)	mutation S249C	25	40	ADN muté pour S249C	POSITIF
	mutation Y375C			ADN muté pour Y375C	POSITIF
	mutation G372C			ADN muté pour G372C	POSITIF
	mutation R248C			ADN muté pour R248C	POSITIF

Test de Méthylation		Valeurs Ct		Interprétation	Détermination du degré de méthylation des 3 gènes cibles
		Min	Max		
Patient (Ref ou Tn)	HS3ST2	25	40	Présence d'allèles méthylés du gène <i>HS3ST2</i>	
	SEPTINE9			Présence d'allèles méthylés du gène <i>SEPTIN9</i>	
	SLIT2			Présence d'allèles méthylés du gène <i>SLIT2</i>	

Rendu du Test Urodiag

Le logiciel Urodiag a été co-développé par Oncodiag et Biomaneio (<https://biomaneio.fr>). Le logiciel permet l'analyse des données PCR, l'interprétation, la gestion des résultats et le rendu du test Urodiag aux urologues. Le résultat du test Urodiag est obtenu sur datas obtenus du **Ref** (diagnostic initial de TVNIM) et ceux obtenus à chaque point de suivi en mois (**Tn**).

Une représentation simplifiée du flux de travail est présentée ci-dessous :



Il sera fourni au client :

- Le logiciel Urodiag
- Manuel de l'utilisateur
- Installation et formation
- Maintenance

▪ Résultat du test Urodiag

Le logiciel Urodiag fournit des résultats de tests basés sur les données obtenues à **Ref** (diagnostic initial de NMIBC) et à chaque point de suivi en mois (**Tn**).

Test de Mutation à Tn		Methylation SCORE	Résultat
Positif	et	≥ -0.021	POSITIF
Positif	et	< -0.021	POSITIF
Négatif	et	≥ -0.021	POSITIF
Négatif	et	< -0.021	NEGATIF

Le test de Mutation est Positif si au moins une des quatre mutations a été détectée.

Le score de méthylation est déterminé par une équation qui prend en compte la somme des pourcentages de méthylation calculés au moment du diagnostic initial (**SUM_Ref**) et aux différents points de suivi Tn du patient (**SUM_Tn**) pour le patient.

▪ Exemple de rendu du test Urodiag pour l'urologue



Urologue Durand
18 Avenue de Bretagne
95127 Cergy

Saint Ouen l'Aumône le 14 Janvier 2020

Objet : Rendu d'analyse Urodiag pour le patient 01

Suite aux analyses réalisées le 01 Juillet 2020, le résultat de suivi Urodiag est le suivant :

NEGATIF

Pour information, voici un tableau récapitulatif des résultats précédents :

Date	Mutation	Methylation	Résultat Urodiag
01/01/2019	POSITIF	1 ^{ère} analyse servant de référence	
01/04/2019	NEGATIF	NEGATIF	NEGATIF
01/07/2019	NEGATIF	NEGATIF	NEGATIF
01/10/2019	NEGATIF	NEGATIF	NEGATIF
01/01/2020	NEGATIF	NEGATIF	NEGATIF
01/04/2020	POSITIF	NEGATIF	POSITIF
01/07/2020	NEGATIF	NEGATIF	NEGATIF

Biologiste responsable

Performances Cliniques

Risque de récurrences	Sensibilité	Valeur Prédictive Négative (NPV)
Tous risques	95%	99%
Elevé	97%	99%
Faible	93%	98%

Sensibilité : Proportion de patients présentant une récurrence lorsque le test Urodiag est positif

Valeur prédictive négative : Probabilité que les patients dont le test Urodiag est négatif n'aient vraiment pas de récurrence.

Caractéristiques de Performance

Limite de détection

- Test de Mutation

S249C	Y375C	R248C	G372C
2.5%	1%	1%	0.5%

- Test de Méthylation

SEPTINE9	SLIT2	HS3ST2
10 pg	10 pg	>10 pg

Spécificité analytique

Les séquences oligonucléotidiques de chaque cible ont été définies par interrogation de la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Stabilité des composés du Kit Urodiag

- Urodiag Urine Filter Kit: 10 ans à compter de la date de la production
- Urodiag Multiplex PCR Kit : 12 mois à compter de la date de la production
- Extraction et purification de l'ADN par le QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN): 12 mois à la date de la livraison
- Conversion de l'ADN par le EZ DNA Modification kit (Zymo Research) : 12 mois à la date de la livraison

Mise au rebut et gestion des déchets

Après utilisation du kit Urodiag, tous les déchets doivent être gérés conformément aux réglementations applicables pour garantir la sécurité du personnel, la protection de l'environnement, et le respect de la confidentialité des données des patients.

Tubes (boîte 1), filtre (boîte 2) : Éliminez ces éléments dans une poubelle DASRI (Déchets d'Activités de Soins à Risques Infectieux) conforme au Code de la Santé Publique (articles R1335-1 à R1335-8). Assurez-vous que les tubes sont bien fermés pour éviter tout risque biologique.

Emballage : Triez les emballages (boîte en carton) selon les filières de recyclage locales, en respectant les symboles de tri indiqués sur les matériaux.

Précautions générales : Si un échantillon d'urine présente des signes de contamination bactérienne (turbidité, odeur inhabituelle), éliminez-le immédiatement en DASRI et demander un nouveau prélèvement pour éviter des résultats erronés. En cas de doute, contactez votre responsable de gestion des déchets ou consultez les autorités locales pour garantir le respect des obligations réglementaires.