



Manuel d'utilisation

KIT URODIAG CE-IVD

Test de surveillance des tumeurs de la vessie
non infiltrant le muscle (TVNIM)

Version V1_2022



Usage en diagnostic in vitro



UR50N (50 Filtres, 60 réactions de PCR)

UR50K (50 Filtres, 50 réactions d'extraction ADN, 55 réactions de Conversion de l'ADN, 60 réactions de PCR)

Table des matières

Protocole de recueil des urines	3
Protocole de filtration des échantillons d'urine	4
Protocole d'extraction et de purification d'ADN	5
Protocole de conversion de l'ADN par le bisulfite de sodium.....	7
Protocole de PCR Multiplexe.....	9
Rendu du test Urodiag.....	15
Caractéristiques de performance	17

Protocole de recueil des urines



RECOMMANDATIONS

- **Boire au moins 1 litre d'eau** chaque jour pendant les 3 jours qui précèdent le recueil des urines
- **Recueillir les premières urines du matin** (il est recommandé de ne pas boire après minuit).

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 **50 à 100 ml 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 échantillons d'urine

Urodiag® Urine Filter Kit

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 :

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

1. Retirer le piston de la seringue et connecter le **Filtre** à la seringue.
2. Introduire 50 ml d'urine, puis 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.



Pour un volume d'urine supérieur à 50 ml, l'opérateur devra déconnecter le filtre 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. Répéter l'étape 1 et introduire 5 ml de PBS 1X, réinsérer le piston dans la seringue et appliquer une légère pression sur le piston. Le filtrat est recueilli dans le flacon à déchets contenant de l'eau de Javel.
5. Déconnecter le **Filtre** de la seringue.

Le Filtre est prêt immédiatement pour la procédure d'extraction d'ADN ou peut être conservé un mois à -20°C et pouvant être expédié congelé 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 à **-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, éteignez 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.

Équipement 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 (+56°C)
- Tampon PBS 1X (Phosphate-buffered saline, sans Mg & Ca) (conservé 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 μ l de tampon **PBS 1X** et 22 μ l 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 μ l 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** (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 a été conservé à -20°C, laissez-le sur la paillasse 5 min à température ambiante avant l'étape de lyse*

6. Introduire 462 μ l 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 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 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 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, ≥10,000 x 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, ≥10,000 x 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, ≥10,000 x 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'éluion **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.
 16. Déterminer la concentration d'ADN par fluorométrie (par exemple : Qubit Fluorometer_Thermo Fisher Scientific-Invitrogen).
 17. Diluer la solution d'ADN à **1,25 ng/µl en Buffer AE**.
- Note :** Si la solution d'ADN est inférieure à 1,25 ng/µl, il faudra la concentrer par chauffage à +50°C en utilisant un bloc chauffant ou un concentrateur d'ADN (speed vacuum). Le volume d'ADN à évaporer est calculé pour obtenir la concentration de 1,25 ng/µl.
18. La solution d'ADN est prête pour l'analyse immédiate ou peut être conservée un mois à -20°C.

Le test de Mutation requiert une quantité de **10 ng d'ADN (1,25 ng/µl)**

Le test de Méthylation requiert une quantité de **15 ng à 30 ng d'ADN (1,25 ng/µl)**. Il est recommandé de réaliser le test de Méthylation à partir de 30 ng d'ADN.

Protocole alternatif de purification de l'ADN en utilisant le QIAvac 24 Plus (Qiagen). Les étapes 11, 12 et 13 peuvent être réalisées à l'aide du **QIAvac 24 Plus**. Allumer la pompe à vide en appuyant sur l'interrupteur d'alimentation. Ajuster l'aiguille du vide à environ **-600 mbar**. Connecter le dispositif VacConnector/colonne QIAamp Mini spin column du QIAvac 24 Plus. Introduire l'échantillon de l'étape 10 (682 µl) dans la colonne QIAamp Mini spin column et laisser le couvercle de la colonne ouvert. Ouvrir la soupape de dépression principale et assurez-vous que l'aiguille est stabilisée à près de -600 mbar. Une fois que tout le lysat a été aspiré à travers la colonne de centrifugation, éteindre la pompe à vide. Introduire 750 µl de la solution de lavage **Buffer AW1** dans la colonne et allumer la pompe à vide. Une fois que toute la solution Buffer AW1 a été aspirée à travers la colonne, éteindre la pompe à vide. Introduire 750 µl de la solution de lavage **Buffer AW2** dans la colonne et allumer la pompe à vide. Une fois que toute la solution AW2 a été aspirée à travers la colonne, éteignez la pompe à vide. Fermer la colonne, retirez-la du système d'aspiration QIAvac et jeter le VacConnector.

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.

Équipement 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, ThermoFischer 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 (DNase, RNase free)

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 μ l d'eau PCR grade et 210 μ l 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** – Additionner 6 ml de **M-Wash Buffer**.

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

A chaque expérience (run)	C+ meth (cap. violet)*	Patient
Echantillon d'ADN (1,25 ng/ μ l)	24 μ l (30 ng)	X μ l (15 ng à 30 ng**)
Eau PCR grade	21 μ l	X μ l (ajuster le volume à 45 μ l)
M-Dilution Buffer	5 μ l	5 μ l
Homogénéiser par « pipetage-refoulement » et centrifuger le tube 2 secondes		

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

** la quantité de **30 ng d'ADN** est recommandée

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 μ l de la solution de conversion à l'échantillon d'ADN (50 μ l) et homogénéiser par « pipetage-refoulement » 5 fois.
7. Transférer l'échantillon d'ADN (150 μ l) 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 μ l) 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 μ l de la solution **M-Binding Buffer** dans la colonne **Zymo-Spin IC Column** munie d'un **tube collecteur**.
11. Additionner l'échantillon (~150 μ l) 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 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 StepOnePlus Real-Time (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









- StepOnePlus Real-Time system
- MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 ml, No. 4346907 et Optical Adhesive Covers, No. 4360954 (ThermoFisher Scientific) ou MicroAmp Fast Reaction Tubes, 0,1 ml (8 tubes/strip, No. 4358293 and MicroAmp Optical 8-Cap Strip, No. 4323032 (ThermoFisher Scientific)
- Micropipettes et pointes stériles avec filtre
- Microcentrifugeuse pour plaque PCR
- Vortex
- Bloc de refroidissement
- Eau PCR grade (DNase, RNase free)

Contenu du kit

Le kit est conçu pour 50 tests PCR correspondant à 120 réactions de PCR pour 5 runs (10 patients au maximum/run). Chaque test PCR ou run comporte 24 réactions de PCR, dont 4 pour le Contrôle de Qualité et 20 réactions de 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 blanc), 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. 1000 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 : Le tube contient un mélange de deux solutions d'ADN : (i) ADN synthétique du gène FGFR3 qui est inséré dans un vecteur plasmidique et comprenant les mutations S249C et Y375C (ii) ADN humain pour détecter le gène de la GLOBINE
		MM mut 2 Lot 0000X Exp. Store at: -15 to -30°C Light sensitive Vol. 1000 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
		C+ mut 2 Lot 0000X Exp. Store at: -15 to -30°C Vol. 22 µL	Contrôle Positif mutation 2 : Le tube contient un mélange de deux solutions d'ADN : (i) ADN synthétique du gène FGFR3 qui est inséré dans un vecteur plasmidique et comprenant les mutations G372C et R248C (ii) ADN humain pour détecter le gène de la GLOBINE
		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. 1000 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. 1000 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 des échantillons

1. Décongeler les tubes dans un bloc réfrigérant (recommandé).
2. Bien homogénéiser les tubes master mix (MM mut 1 et MM mut 2) par 5 retournements et les tubes contrôles ADN (C+ et C-) par tapotage.
3. Centrifuger brièvement l'ensemble des tubes pour collecter les solutions au fond des tubes.

- **Test de Mutation**

Il est recommandé de réaliser le test de Mutation avec **10 ng d'ADN** (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 aux recommandations du Tableau 1 ci-dessous.

Tube	Contrôle				Patient	
	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	/	/	/	/	4 µl	4 µl
Volume final	20 µl					

- **Test de Méthylation**

Il est recommandé de réaliser le test de Méthylation avec **30 ng d'ADN converti au bisulfite de sodium** (15 ng d'ADN bisulfité pour la quantification des gènes ALBUMINE et SEPTINE9 et 15 ng d'ADN bisulfité pour la quantification des gènes HS3ST2 et SLIT2).

Note : Pour l'échantillon patient, la quantité minimale d'ADN converti au bisulfite est de 15 ng, soit 7,5 ng pour la quantification des gènes ALBUMINE et SEPTINE9 et 7,5 ng pour la quantification des gènes HS3ST2 et SLIT2.

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

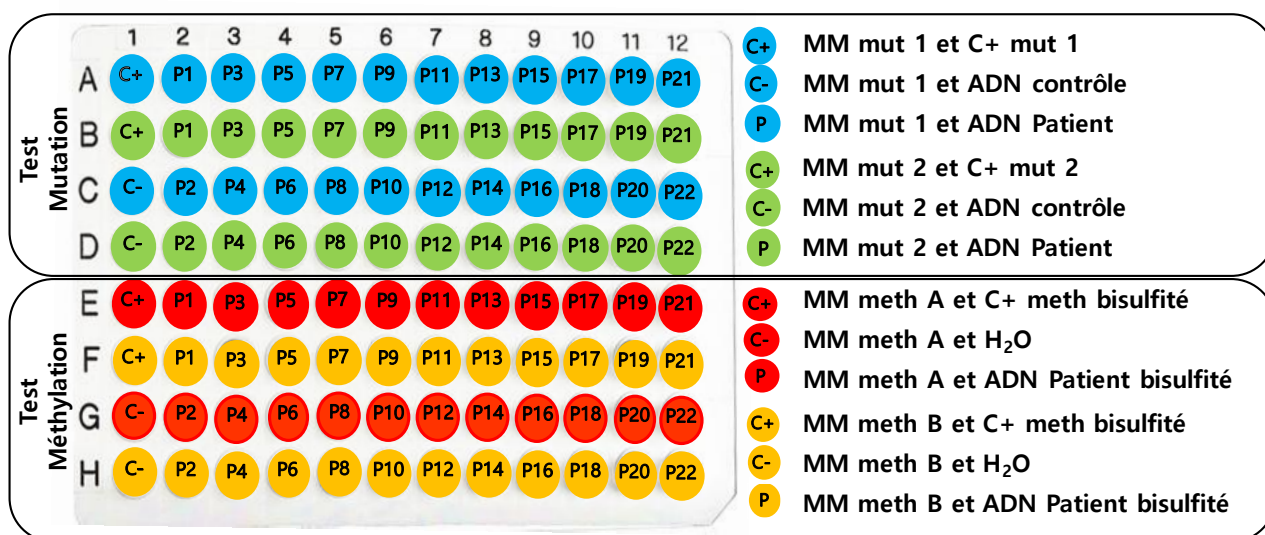
Tube	Contrôle				Patient	
	Contrôle 1		Contrôle 2		Test 1	Test 2
	Positive	Negative	Positive	Negative		
MM meth A	16 µl	16 µl	/	/	16 µl	/
MM meth B	/	/	16 µl	16 µl	/	16 µl
C+ meth*	4 µl	/	4 µl	/	/	/
ADN patient*	/	/	/	/	4 µl	4 µl
H ₂ O, PCR grade	/	4 µl	/	4 µl	/	/
Final volume	20 µl					

* ADN converti au bisulfite de sodium

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) pour analyser 22 patients.

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



2- Après avoir recouvert la plaque 96 puits avec le film optique ou fermer les tubes PCR avec les capuchons (qualité optique), homogénéiser le mélange réactionnel par vortexage pendant 2 secondes.

3- Centrifuger la plaque PCR 96 puits ou les tubes PCR à l'aide d'un rotor de microplaque pendant 10-15 secondes à environ 1000 x g (3000 rpm).

Etape 3: Programmation du StepOnePlus Real-Time system

La configuration de la réaction PCR est enregistrée dans le fichier URODIAG_TEMPLATE_PCR.edt.

L'opérateur devra importer le fichier URODIAG_TEMPLATE_PCR.edt dans le StepOnePlus.

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 Threshold (ΔRn)	0.24
	G372C 0.15
	S249C 0.15
	Y375C 0.15
	GLOBINE 0.15
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 Threshold (ΔRn)	0.10
	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	5 min	95°C	-
Dénaturation	40	45 s	95°C	-
Hybridation/extension		45 s	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	28	32	PASSE
		Mutations FGFR3 : G372C, R248C, S249C et Y375C	28	33	PASSE
	Négatif	GLOBINE	28	32	PASSE
		Mutations FGFR3 : G372C, R248C, S249C et Y375C	Pas d'amplification		PASSE
Patient	Positif	GLOBINE	28	32	PASSE

Test de Méthylation			Valeurs Ct		Rendu
			Min	Max	
Contrôle	Positif	Cibles : ALBUMINE, HS3ST2, SEPTINE9 et SLIT2	26	30	PASSE
	Négatif	Cibles: ALBUMINE, HS3ST2, SEPTINE9 et SLIT2	Pas d'amplification		PASSE
Patient	Positif	ALBUMINE	26	30	PASSE

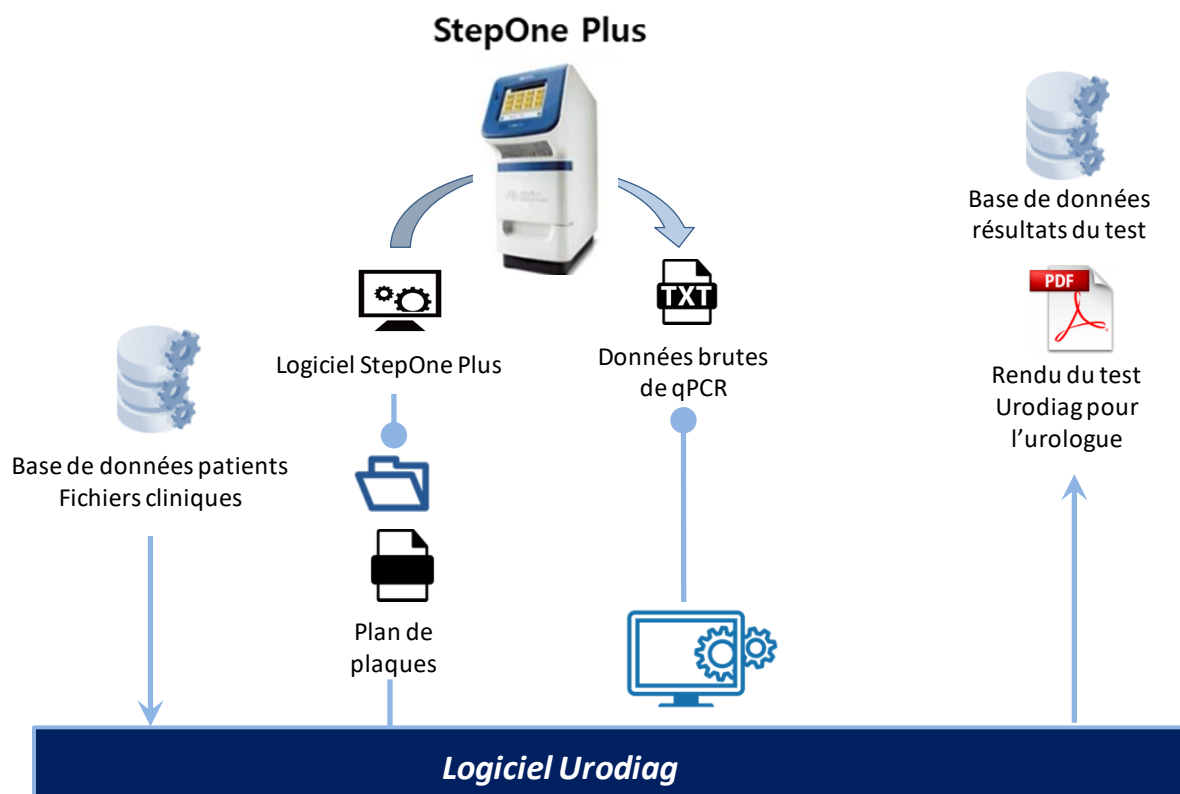
▪ Patient

Test de Mutation		Valeurs Ct		Interprétation	Résultat
		Min	Max		
Patient	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	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 Biomaneu (<https://biomaneu.fr>). Le logiciel permet l'analyse des données PCR, l'interprétation, la gestion des résultats et le rendu du test Urodiag aux urologues. 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

MUTATION	METHYLATION	RESULTAT DU TEST URODIAG
POSITIF	POSITIF	POSITIF
POSITIF	NEGATIF	
NEGATIF	POSITIF	
NEGATIF	NEGATIF	NEGATIF

▪ 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

Caractéristiques de performance

Limite de détection

- Test de Mutation = 5% (rapport allèle muté/allèle non muté) correspond à la limite de détection des mutations FGFR3.
- Test de Méthylation = 10 pg est la plus faible quantité d'ADN contrôle (ADN humain 100% méthylé et modifié) nécessaire à la détection des allèles méthylés SEPTINE9, HS3ST2 et SLIT2.

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 and purification DNA by QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN): 12 mois à la date de la livraison
- DNA conversion by EZ DNA Modification kit (Zymo Research) : 12 mois à la date de la livraison