

Septembre 2023

Urodiag PCR Kit Handbook



Version 2



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



UR50N



OncoDiag
9 rue de Pacy
27930 Miserey



www.oncodiag.fr



Historique des révisions : Historique des révisions du manuel PCR Kit Handbook v1

Révision	Description
E	Changement du fichier de configuration de la réaction PCR. Mise à jour dans le fichier URODIAG_TEMPLATE_PCR_V2.edt
D	Changement dans le protocole PCR des seuils de positivité du test de mutation et du test de méthylation
C	Changement par l'opérateur des intervalles de confiance dans le logiciel Urodiag (valeurs des Cts min et max)
B	Remplacement dans le protocole PCR des mastermix QuantiFast et Kapa par le master mix QuantiTect.
A	Nouveau manuel d'utilisation Urodiag Handbook_v2_2023_FR

Table des matières

Utilisation Prévue.....	4
Principe de la Procédure	4
Matériels Fournis	4
Matériels Requis mais Non Fournis.....	5
Protocole de Recueil des Urines	6
Protocole de Filtration des Echantillons d'Urine	7
Protocole d'Extraction et de Purification d'ADN.....	8
Protocole de Conversion de l'ADN par le Bisulfite de Sodium.....	10
Protocole de PCR Multiplexe.....	12
Rendu du Test Urodiag	18
Performances Cliniques	20
Caractéristiques de Performance	20

Utilisation Prévue

Le kit PCR Urodiag est un test de diagnostic in vitro pour la surveillance du 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).

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 filtres	50
<ul style="list-style-type: none">▪ 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

- StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems_ThermoFisherScientific)
- StepOne Software v2.3
- Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) ou équivalent

Protocole de Recueil des Urines



RECOMMANDATIONS

- Apport journalier d'au moins 1,5 litre d'eau
- Ne pas boire après 21 h la veille au soir du prélèvement des urines
- Recueillir les premières urines du matin

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 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 :

- Echantillon urinaire compris entre **50 ml et 100 ml**
- Seringue 50 ml luer-lock (Terumo)
- Solution de 1X PBS (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** 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



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. Retirer le piston de la seringue et connecter le **Filtre** 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** de la seringue.
8. **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
- 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 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 paille 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'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.
16. Déterminer la concentration d'ADN par fluorométrie (par exemple : Qubit Fluorometer_Thermo Fisher Scientific-Invitrogen).
17. La solution d'ADN 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 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 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.

Note: 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 (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** – 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. Le volume réactionnel est de 50 µl.

A chaque expérience (run)	C+ meth (cap. violet)* (1,25 ng/µl)	Patient (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 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 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 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 (ThermoFisher Scientific)
- 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 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 : 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. 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
		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. 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

- Décongeler les tubes dans un bloc réfrigérant (recommandé),
- Vortexer 1 à 2 secondes les tubes master mix (MM mut 1, MM mut 2, MM Meth A et MM Meth B), les tubes contrôles ADN (C+ mut 1, C+ mut 2, C- mut et C+ meth converti au bisulfite) et les tubes ADN patients,
- Centrifuger 1 à 2 secondes l'ensemble des tubes pour collecter les mélanges réactionnels au fond des tubes.

- Test de Mutation**

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 (1,25 ng/µl)	/	/	/	/	4 µl	4 µl
Volume final	20 µl					

- Test de Méthylation**

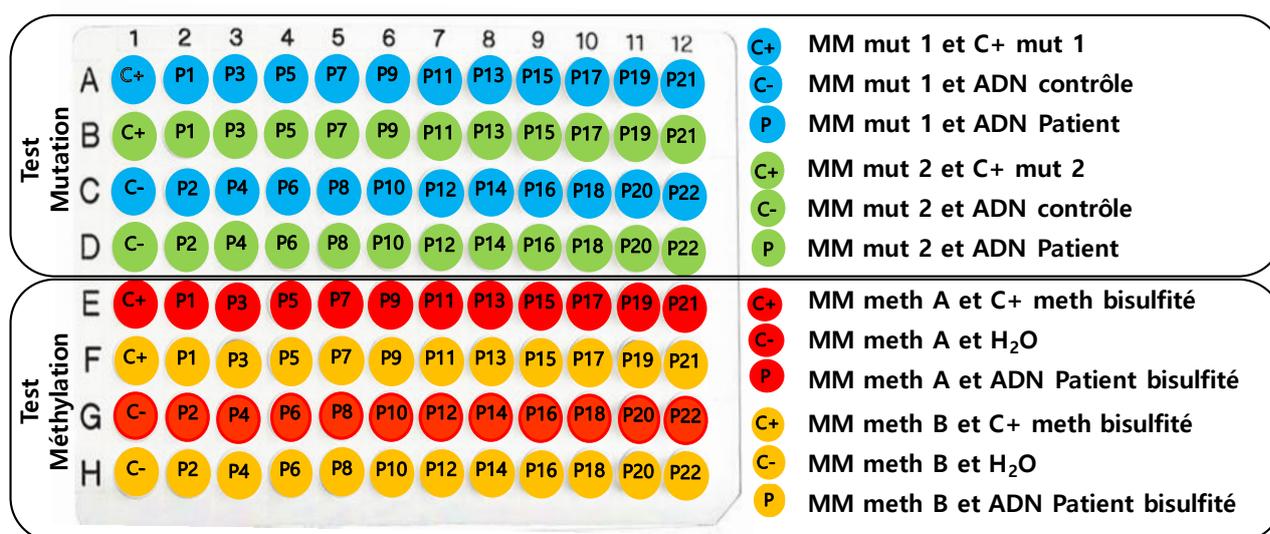
Préparer les échantillons conformément aux recommandations du Tableau 2 ci-dessous.

Tube	Contrôle				Patient	
	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 (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) pour analyser 22 patients.

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 StepOnePlus Real-Time system

La configuration de la réaction PCR est enregistrée dans le fichier URODIAG_TEMPLATE_PCR_V2.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)	Standard
Taux de rampe (Ramp rate)	100%
Seuil de positivité ou Threshold (ΔRn)	R248C 0.52 G372C 0.15 S249C 0.125 Y375C 0.12 GLOBINE 0.06
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)	Standard
Taux de rampe (Ramp rate)	100%
Seuil de positivité ou Threshold (ΔRn)	ALBUMINE 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	15:00 min	95°C	-
Dénaturation	40	01:00 min	94°C	-
Hybridation/extension		01:00 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	28	32	PASSE
		Mutations FGFR3 : G372C, R248C, S249C et Y375C	27	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	ALBUMINE, HS3ST2, SEPTINE9 et SLIT2	27	31	PASSE
	Négatif	ALBUMINE, HS3ST2, SEPTINE9 et SLIT2	Pas d'amplification		PASSE
Patient	Positif	ALBUMINE	27	31	PASSE

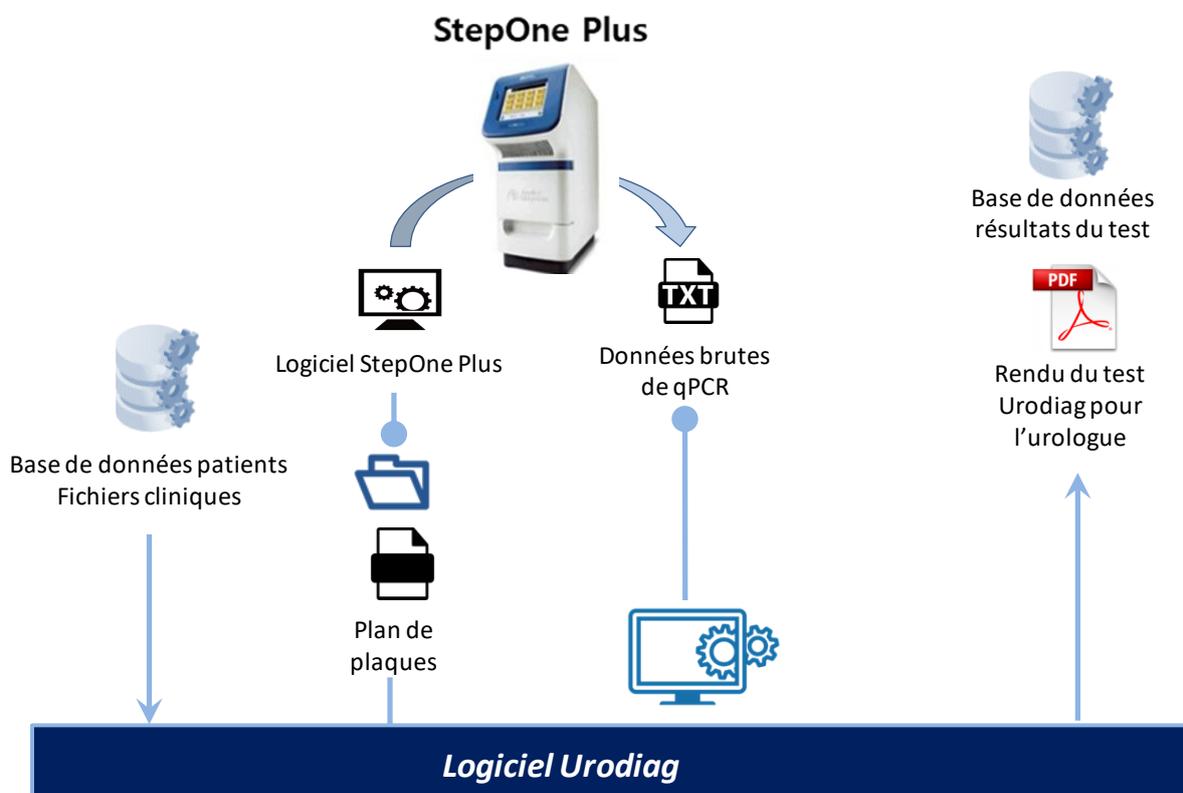
▪ Patient

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

Performances Cliniques

Groupes à risque de récurrence	Sensibilité	Spécificité	Valeur Prédicative Négative (VPN)
Tous risques	95 %	76 %	99 %
Elevé	97 %	79 %	99 %
Bas	93 %	75 %	98 %

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

Spécificité : Proportion de patients ne présentant pas de récurrence et dont le test Urodiag est négatif.

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 = 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 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