



# **Plasma-SeqSensei™**














## **Breast Cancer IVD Kit**

Mode d'emploi

Décembre 2023

ZR150547.R3

## TEST IN VITRO/À utiliser pour le diagnostic in vitro

Glossaire des symboles			
	Fabricant		Utiliser jusqu'au
	Référence du catalogue		Référence du lot
	Quantité suffisante pour <n> tests		Attention
	Limite de température		Consulter la notice d'utilisation
	Diagnostic in vitro		Ne pas réutiliser
	Conserver à l'abri de la lumière		Conserver au sec
	Limite d'humidité		

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Usage prévu .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Principe du test .....</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Régions couvertes .....</b>	<b>7</b>
<b>5</b>	<b>Interprétation des résultats de variants .....</b>	<b>8</b>
<b>6</b>	<b>Limites .....</b>	<b>9</b>
<b>7</b>	<b>Réactifs, consommables et équipement .....</b>	<b>10</b>
7.1	Matériel fourni.....	11
7.2	Matériel non fourni.....	13
7.3	Consommables.....	14
7.4	Équipement.....	14
<b>8</b>	<b>Stockage et manipulation.....</b>	<b>16</b>
8.1	Conditions d'expédition.....	16
8.2	Précautions générales de manipulation .....	16
8.3	Avertissements et précautions .....	17
8.3.1	Mesures spécifiques.....	17
8.3.2	Manipulation et stockage.....	17
8.3.3	Précautions pour la manipulation de réactifs .....	18
8.3.4	Précautions de sécurité et prévention des contaminations .....	19
<b>9</b>	<b>Protocole .....</b>	<b>21</b>
9.1	PCR avec IDU (PCR multiplexe).....	22
9.2	Purification PCR avec IDU.....	28
9.3	PCR avec index .....	32
9.4	Purification PCR avec index.....	37
9.5	Contrôle qualité de la librairie (Bioanalyzer) .....	41
9.6	Séquençage sur Illumina NextSeq™ 500/550 .....	46
<b>10</b>	<b>Assistance technique .....</b>	<b>50</b>
<b>11</b>	<b>Caractéristiques de performance .....</b>	<b>51</b>
11.1	Sensibilité analytique.....	51
11.2	Spécificité analytique.....	51
11.3	Précision/Répétabilité.....	51
11.4	Plage de mesure/Linéarité.....	52
11.5	Substances interférentes .....	52
11.6	Performance et caractéristiques cliniques .....	52
11.7	Limites .....	53
<b>12</b>	<b>Glossaire et terminologie .....</b>	<b>54</b>
<b>13</b>	<b>Références.....</b>	<b>56</b>
<b>14</b>	<b>Copyrights et marques déposées.....</b>	<b>57</b>
<b>15</b>	<b>Historique des révisions .....</b>	<b>58</b>

### 1 Usage prévu

Le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit est un dispositif de test quantitatif de séquençage de nouvelle génération (Next-Generation Sequencing, NGS) destiné à détecter et à identifier les mutations sur les gènes ciblés AKT1, ERBB2, ESR1, KRAS, PIK3CA et TP53 dans l'ADN libre circulant (cfDNA) humain, isolé du plasma sanguin, chez les patients atteints de cancer du sein. Le but est de détecter toute maladie résiduelle minimale, surveiller la récurrence et contrôler la réponse aux traitements (néo)adjuvants chez les patients.

Le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit doit uniquement être utilisé conjointement au logiciel Plasma-SeqSensei™ IVD pour atteindre son utilisation prévue. Il doit être effectué par du personnel formé dans un environnement de laboratoire professionnel. Les informations générées ne doivent jamais être le seul facteur déterminant pour la prise de décisions médicales.

**Remarque :** *Le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit n'est pas destiné à être utilisé pour le dépistage, le diagnostic d'un cancer ou comme diagnostic compagnon (Companion Diagnostics).*

## 2 Introduction

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué et la principale cause de décès dû au cancer chez les femmes, à travers le monde entier (1). Au cours de ces dernières années, des recherches complètes concernant la chirurgie curative, la thérapie (néo)adjuvante ainsi que la thérapie ciblée ont été menées, entraînant une hausse du taux de survie (2).

Les cellules tumorales victimes d'une apoptose, d'une nécrose ou d'une sécrétion métabolique libèrent de très petites quantités de leur ADN dans le flux sanguin. La fraction de cfDNA spécifique à la tumeur s'appelle également l'ADN tumoral circulant (ctDNA) et contient les informations génétiques de la tumeur primitive et même des métastases. Une multitude d'études de recherche et d'essais ont démontré l'application clinique du profilage de ctDNA à différents stades du traitement du cancer, notamment le choix de la thérapie, le pronostic et le suivi (3).

Diverses technologies basées sur le NGS sont disponibles pour la détection de ctDNA. Toutefois, en raison des biais/erreurs de PCR, la plupart d'entre elles sont inappropriées pour la détection des variants rares. Plasma-SeqSensei™ est une nouvelle technologie basée sur le NGS qui met en place des identifiants moléculaires uniques (IDU) dans le protocole de séquençage. Il en résulte une réduction considérable du bruit de fond, entraînant une sensibilité très élevée de la technologie Plasma-SeqSensei™ (4).

### 3 Principe du test

Le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit détecte les mutations géniques dans le ctDNA isolé du plasma sanguin. Pour accroître la sensibilité de la méthode, les fragments d'ADN sont étiquetés à l'aide d'IDU durant la première étape d'amplification. Cela aboutit à la formation de familles d'IDU composées de diverses copies de chaque IDU attribué. Durant la deuxième étape d'amplification, chaque membre d'une famille d'IDU se voit également attribuer un code-barres spécifique au puits et à la plaque (4). Pour des raisons de validité, un contrôle d'entrée de qualification interne (Quantispike) est inclus en plus des contrôles positifs et négatifs externes à chaque cycle.

Le protocole inclut l'analyse automatisée des données et la génération de rapports à l'aide du logiciel Plasma-SeqSensei™ IVD. Le logiciel quantifie l'entrée de cfDNA et identifie les supermutants, qui sont des familles d'IDU dans lesquelles au moins 90 % de l'ensemble des fragments PCR contiennent des mutations identiques. Ce concept permet de discriminer les mutants réels des artefacts PCR ou de séquençage présents uniquement dans un très faible nombre de membres de la famille d'IDU. Le processus central de la technologie Plasma-SeqSensei™ est présenté dans la Figure 1.

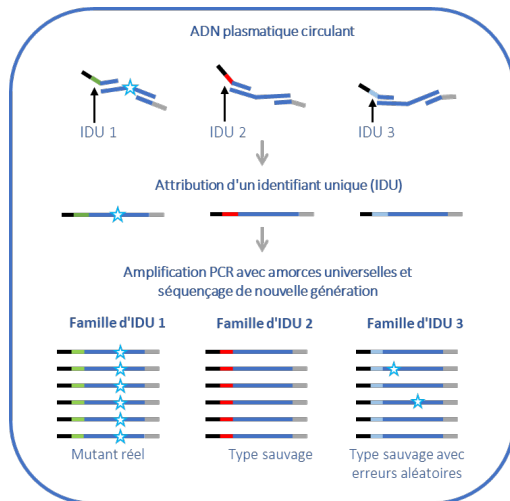
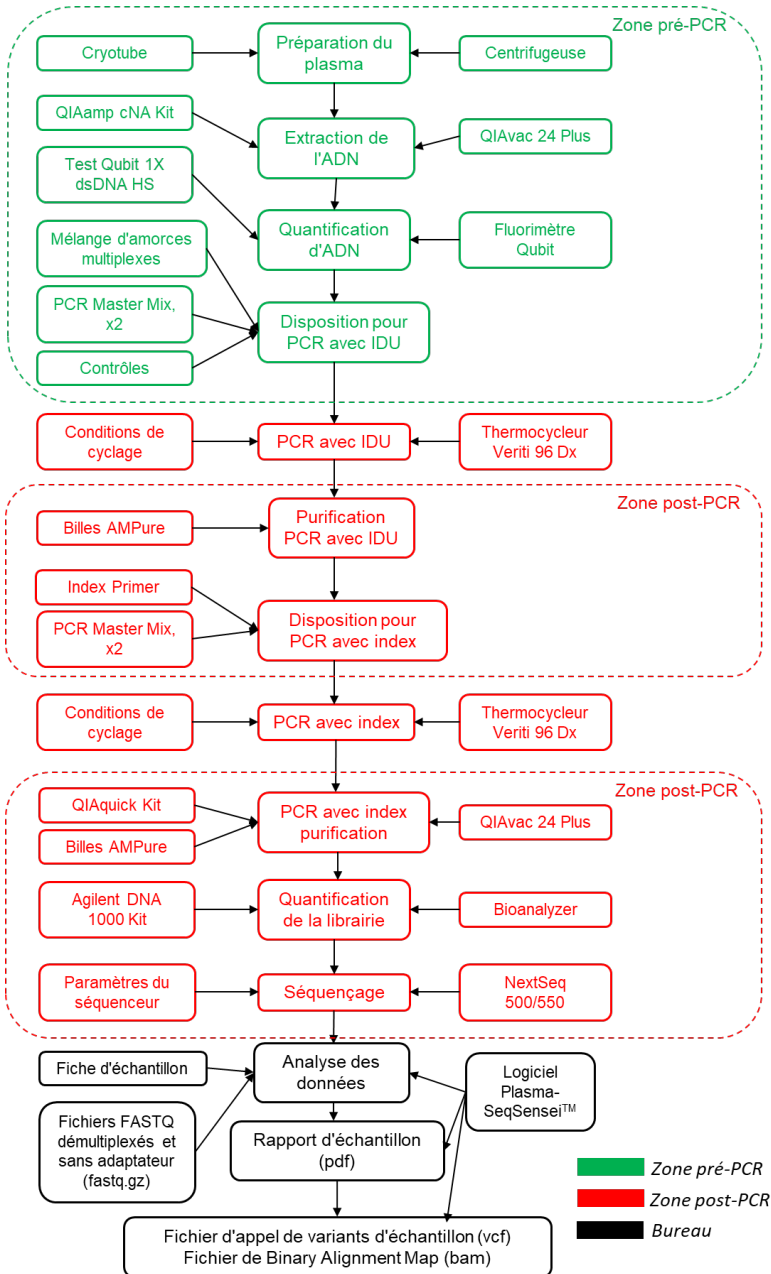


Figure 1 : Principe de la technologie Plasma-SeqSensei™



**Figure 2 : Présentation du protocole de la méthode Plasma-SeqSensei™**

## 4 Régions couvertes

**Tableau 1 : Régions couvertes par le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit**

Gène	Produit de la transcription*	Début de la séquence de codage	Fin de la séquence de codage	Acide aminé de départ	Acide aminé de fin
AKT1	ENST00000554581.1	47	69	17	23
ERBB2	ENST00000269571.5	907	947	303	315
ERBB2	ENST00000269571.5	2 258	2 307	754	769
ERBB2	ENST00000269571.5	2 308	2 360	770	786
ESR1	ENST00000440973.1	1 108	1 143	370	381
ESR1	ENST00000440973.1	1 378	1 420	460	473
ESR1	ENST00000440973.1	1 583	1 614	529	538
KRAS	ENST00000256078.4	8	43	4	14
PIK3CA	ENST00000263967.3	254	278	86	92
PIK3CA	ENST00000263967.3	329	352	111	117
PIK3CA	ENST00000263967.3	353	367	119	122
PIK3CA	ENST00000263967.3	1 033	1 058	345	352
PIK3CA	ENST00000263967.3	1 085	1 115	363	371
PIK3CA	ENST00000263967.3	1 252	1 264	418	421
PIK3CA	ENST00000263967.3	1 348	1 387	450	462
PIK3CA	ENST00000263967.3	1 611	1 659	538	553
PIK3CA	ENST00000263967.3	2 138	2 184	714	728
PIK3CA	ENST00000263967.3	3 118	3 169	1 040	1 056
TP53	ENST00000269305.4	144	232	49	77
TP53	ENST00000269305.4	293	375	99	125
TP53	ENST00000269305.4	376	423	126	141
TP53	ENST00000269305.4	451	537	151	179
TP53	ENST00000269305.4	574	659	192	219
TP53	ENST00000269305.4	695	782	233	260
TP53	ENST00000269305.4	783	856	262	285
TP53	ENST00000269305.4	888	919	297	306
TP53	ENST00000269305.4	920	993	308	331
TP53	ENST00000269305.4	994	1 080	332	360

\* Source de la séquence : Base de données Ensemble



### 5 Interprétation des résultats de variants

Le test est conçu pour détecter les mutations somatiques dans le ctDNA dérivé du plasma. Les résultats de ce test peuvent servir de complément au bilan de santé du médecin prescripteur et, en tant que tels, doivent être interprétés dans le contexte des découvertes cliniques, de la pathologie tumorale et autres données de laboratoire par un professionnel de santé qualifié.

#### Fréquences de mutation :

Les fréquences de mutation sont consignées à la fois comme FAM (fraction d'allèle mutant) et comme nombre absolu de MM (molécules mutantes). La FAM correspond à la proportion de ctDNA mutant par rapport à la quantité totale de cfDNA. La FAM peut être utilisée pour confirmer la présence ou l'absence de mutations. Toutefois, elle peut ne pas refléter la masse tumorale globale, car la proportion de ctDNA par rapport à la quantité totale de cfDNA dans un échantillon peut être affectée par divers facteurs, notamment la localisation anatomique de la tumeur, le renouvellement cellulaire de la tumeur, la vascularité, le traitement, les procédures d'échantillonnage sanguin, la gestion des échantillons et les caractéristiques cliniques du patient n'étant pas liées au stade de la tumeur (5). Le nombre absolu de MM détecté pour un variant donné représente le nombre total de molécules détectées dans un échantillon et peut fournir des renseignements directs sur les caractéristiques de la biologie tumorale qui sont uniques à chaque patient (5)(6).

#### Variants consignés :

Les variants ayant un impact fonctionnel caractérisé probable ou prédit sont consignés. Ils sont basés sur des bases de données publiquement disponibles, telles que COSMIC (7) et/ou de la documentation scientifique évaluée par les pairs consignée (6)(8)(9). En outre, les variants suspectés d'origine germinale, comme indiqué par une FAM observée comprise entre 40 % et 60 % ou une FAM observée supérieure à 90 %, sont indiqués dans un tableau distinct sur le rapport.

### 6 Limites

Les mutations germinales suspectées sont exclues des rapports de mutations somatiques sur la base des valeurs de FAM observées. Toutefois, elles sont répertoriées dans un tableau distinct et marquées comme mutations germinales potentielles, puisque ce test ne peut pas déterminer définitivement si ces mutations sont d'origine germinale sans effectuer d'analyse des cellules saines correspondantes.

De plus, les mutations signalées pour certains gènes dans un petit sous-ensemble de patients peuvent être le résultat d'une hématoopoïèse clonale et doivent être statuées via une analyse des cellules sanguines correspondantes.

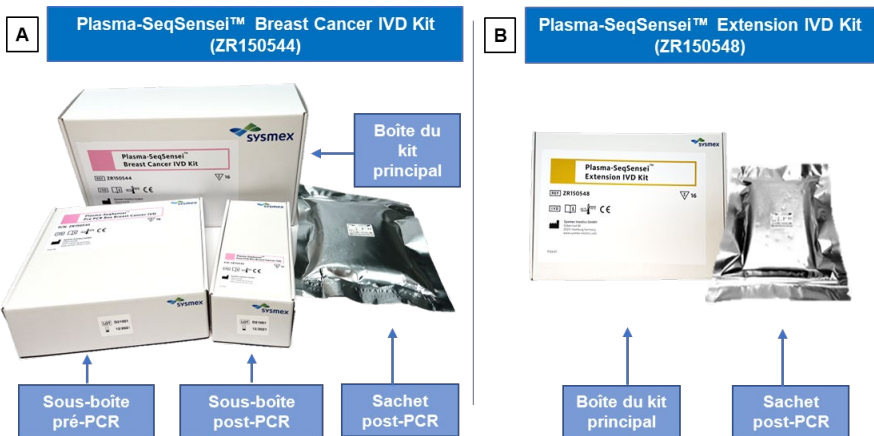
La détectabilité du ctDNA dépend de divers facteurs, notamment la masse tumorale, la biologie tumorale, les conditions de recueil des échantillons, l'hétérogénéité des échantillons et les caractéristiques cliniques. Le test s'est révélé avoir des variations faibles mais détectables en fonction du contexte de la séquence, en particulier sur les échantillons ayant un nombre de molécules cible proche du seuil.

Ce test détecte les changements de nucléotides et les changements d'acides aminés qui en résultent sont décrits dans le rapport. Dans le cas de triplets de nucléotides codant pour des acides aminés qui ne sont que partiellement couverts (bordures d'amplicon), l'annotation des acides aminés dans le rapport repose sur l'hypothèse que les bases non couvertes par le dosage correspondent à la séquence de référence.

Le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit a été testé pour détecter les types suivants de mutations somatiques : les variations mononucléotidiques (VMN), les insertions (jusqu'à 27 nucléotides), les délétions (jusqu'à 48 nucléotides) et les variants de délétion/d'insertion (jusqu'à 17 nucléotides).

## 7 Réactifs, consommables et équipement

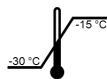
Le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit contient deux sous-boîtes et un sachet. L'une des boîtes doit être stockée dans le laboratoire pré-PCR et l'autre boîte ainsi que le sachet contenant la Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate doivent être stockés dans le laboratoire post-PCR. Il est vivement recommandé de séparer les boîtes du kit dès l'arrivée dans deux laboratoires distincts afin de minimiser le risque de contamination des réactifs. La boîte pré-PCR est destinée à être utilisée dans un laboratoire où il n'y a pas de manipulation d'ADN amplifié. La boîte post-PCR et le sachet sont destinés à être utilisés dans un laboratoire où les flacons/plaques de réaction PCR sont ouverts et utilisés.



**Figure 3 : Présentation des boîtes du Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit avec sachet (A) et de la boîte du Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit et du sachet (B), avec leurs lieux de stockage respectifs (zones pré/post-PCR).**

### 7.1 Matériel fourni

Le matériel fourni est essentiel pour le test et ne peut pas être remplacé par d'autres produits.



Le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit doit être stocké à une température comprise entre -15 °C et -30 °C lorsqu'il n'est pas utilisé.

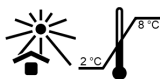


Une fois ouverts, les réactifs sont stables pendant 30 jours ou jusqu'à la date d'expiration, selon le cas qui survient en premier (hors eau).

**Tableau 2 : Matériel fourni avec le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit (ZR150544)**

Boîte	Nom * (couleur du bouchon)	N° de cat.	Tubes	Cycles de congélation-décongélation	Température de stockage
Boîte pré-PCR	Breast Cancer Mpx A (bleu)	ZR851013	4	2	De -15 °C à -30 °C
	Breast Cancer Mpx B (jaune)	ZR851014	4	2	De -15 °C à -30 °C
	Breast Cancer Positive Control (rouge)	ZR855006	4	2	De -15 °C à -30 °C
	No Template Control (transparent)	ZR854002	4	2	De -15 °C à -30 °C
	Quantispike (vert)	ZR856001	4	2	De -15 °C à -30 °C
	PCR Master Mix v2, x2 (noir)	ZR850001	4	4	De -15 °C à -30 °C
Sachet post-PCR	Index Primer Plate IND34 <sup>1,2</sup>	ZR852004	1	N.D.	De -15 °C à -30 °C
Boîte post-PCR	PCR Master Mix v2, x2 (noir)	ZR850001	2	4	De -15 °C à -30 °C
	Water, nuclease-free (blanc/transparent)	ZR224006	1	N.D.	De -15 °C à -30 °C

\* Les noms peuvent différer par l'ajout de PSS avant le nom, en fonction du lot de kit.



<sup>1</sup> Protégez les plaques contre toute exposition à la lumière. Après la première utilisation, la Index Primer Plate doit être stockée à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

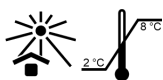
<sup>2</sup> La Index Primer Plate IND34 est également appelée Plaque A dans le protocole et sur le logiciel Plasma-SeqSensei™ IVD.

S'il y a plus de 16 échantillons à analyser sur le même cycle de séquençage, vous devez commander un Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit.

**Tableau 3 : Matériel fourni avec le Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit (ZR150548)**

Boîte	Nom * (couleur du bouchon)	N° de cat.	Tubes	Cycles de congélation-décongélation	Température de stockage
Sachet post-PCR	Index Primer Plate IND35 <sup>1,2</sup>	ZR852005	1	N.D.	De -15 °C à -30 °C

\* Les noms peuvent différer par l'ajout de PSS avant le nom, en fonction du lot de kit.



<sup>1</sup> Protégez les plaques contre toute exposition à la lumière. Après la première utilisation, la Index Primer Plate doit être stockée à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

<sup>2</sup> La Index Primer Plate IND35 est également appelée Plaque B dans le protocole et sur le logiciel Plasma-SeqSensei™ IVD.

**Tableau 4 : Composition du matériel fourni**

Nom	Composition
Breast Cancer Mpx A	Primer Tris EDTA Buffer
Breast Cancer Mpx B	Primer Tris EDTA Buffer
Breast Cancer Positive Control	Double-stranded synthetic DNA wild-type/mutant Tris EDTA Buffer Carrier RNA
No Template Control	Tris EDTA Buffer
Quantispike	Double-stranded synthetic DNA Tris EDTA Buffer Carrier RNA
Index Primer Plate	Index primers (well-specific) Bromophenol blue
PCR Master Mix v2, x2	Hot-Start Polymerase PCR Buffer dNTPs
Water, nuclease-free	Nuclease-free water, molecular biology grade



Tous les composants liquides et secs du kit sont réservés à un usage unique. Chaque puits de l'Index Primer Plate est réservé à un usage unique.

Les tubes contenant les réactifs sont des réactifs à usage multiple. En effet, ils peuvent être décongelés et congelés conformément au Tableau 2 afin de prélever du liquide pour les étapes indiquées du protocole.

### 7.2 Matériel non fourni

Les produits pour lesquels les détails concernant le fabricant/fournisseur et le numéro de commande sont indiqués dans les Tableau 5, Tableau 6 et Tableau 7 sont essentiels au test et ne doivent pas être interchangés avec des produits ayant une qualité et/ou des propriétés comparables.

**Tableau 5 : Matériel non fourni avec le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit**

Matériel	Produit
Réactifs et kits	Éthanol (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.
	RNase and DNase free distilled water
	* Agencourt® AMPure® XP, Beckman Coulter, n° A63881
	* Buffer EB (tampon d'éluion), QIAGEN, n° 19086
	* QIAquick® PCR Purification Kit, QIAGEN, n° 28104 ou n° 28106
	* Buffer PB, QIAGEN, n° 19066
	* DNA 1000 Kit, Agilent, n° 5067-1504 <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Puces microfluidiques</li> <li>■ Réactifs</li> </ul>
	* Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher, n° Q33230 (100 réactions) ou n° Q33231 (500 réactions)
	Hydroxyde de sodium (NaOH), 1 M
	Solution de chlorhydrate Trizma® pH 7,0, 1 M
	* NextSeq™ 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cycles), Illumina, n° 20024904 Pièces du kit : <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Cartouche de réactif Mid Output (150 cycles), n° 15057940</li> <li>■ Cartouche avec cuve de circulation Mid Output, n° 20022409</li> <li>■ Cartouche de tampon, n° 15057941</li> <li>■ Tampon d'hybridation (HT1), n° 15058251</li> </ul>
	* NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (150 cycles), Illumina, n° 20024907 Pièces du kit : <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Cartouche de réactif High Output (150 cycles), n° 15057931</li> <li>■ Cartouche avec cuve de circulation High Output, n° 20022408</li> <li>■ Cartouche de tampon, n° 15057941</li> <li>■ Tampon d'hybridation (HT1), n° 15058251</li> </ul>

\* Composants essentiels ; ne pas les interchanger avec des produits ayant une qualité et/ou des propriétés comparables.

### 7.3 Consommables

**Tableau 6 : Consommables requis pour le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit**

Équipement de laboratoire	Produit
Embouts de pipette / Pipettes sérologiques	Embouts de pipette stériles, résistants aux aérosols, munis de filtres de 2, 10, 20, 200, 1 000 µl
Tubes de réaction	Tubes de 15, 5, 2, 1,5 ml
	* Tubes d'ADN LoBind® de 1,5 ml, Eppendorf, n° 0030108051
	* Tubes de test Qubit™, Thermo Fisher, n° Q32856
	Barrettes de tubes avec bouchons (1,3 ml)
Plaques à 96 puits	* Plaque de PCR, 96 puits, segmentée, à jupe, Thermo Scientific, n° AB0900 ou n° AB2400 (requis pour la PCR)
	Plaque de PCR Multiply® à 96 puits, sans jupe latéral, Sarstedt (facultative, uniquement pour les dilutions)
Feuille d'hermétisation pour les plaques à 96 puits	Papier aluminium
	Film adhésif transparent
Équipement de protection	Blouses de protection, protège-bras, lunettes, surchaussures jetables, gants
Divers	Réservoirs de réactif jetables (25 ml)
	* Tubes d'extension de 3 ml pour distributeurs à vide QIAvac, QIAGEN, n° 19587
	* VacConnectors (500) pour distributeurs à vide QIAvac, QIAGEN, n° 19407

\* Composants essentiels ; ne pas les interchanger avec des produits ayant une qualité et/ou des propriétés comparables.

### 7.4 Équipement

**Tableau 7 : Équipement requis pour le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit**

Équipement de laboratoire	Produit
Instruments électroniques	Centrifugeuse pour tubes de 1,5/2 ml, capacité de 20 000 × g, rotor à angle fixe
	Centrifugeuse pour tubes de 15/50 ml, capacité de 7 197 × g, rotor à angle fixe
	Centrifugeuse pour plaques à 96 puits, capacité de 1 000 × g, rotor à angle fixe

## 7 Réactifs, consommables et équipement

Équipement de laboratoire	Produit
	Mini-centrifugeuse, capacité $\leq 2\ 000 \times g$
	Vortexer avec logements pour tubes et plaques à 96 puits
	Vortexer avec logement pour puces Agilent DNA, capacité de 2 400 tr/min
	Congélateur, $-15\ ^\circ\text{C}$ à $-30\ ^\circ\text{C}$
	Réfrigérateur, $2\ ^\circ\text{C}$ à $8\ ^\circ\text{C}$
	Station de traitement de l'ADN / Cabine PCR
	Hotte (fortement recommandée)
	Enceintes de sécurité biologique de classe II (fortement recommandées)
	QIAGEN Connecting System
	QIAvac 24 Plus System
	Pompe à vide (230 V, 50 Hz)
	Thermocycleur Veriti Dx à 96 puits ou équivalent*
	Agilent 2100 Bioanalyzer System
	Chip Priming Station, Agilent, n° 5065-4401
	Illumina NextSeq™ 500/550
2100 Expert Software, Agilent Technologies	
Pipettes	Pipette de 1 000 $\mu\text{l}$ , 200 $\mu\text{l}$ , 20 $\mu\text{l}$ , 10 $\mu\text{l}$ , 2 $\mu\text{l}$
	Pipette à 8 ou 12 canaux de 200 $\mu\text{l}$ , 20 $\mu\text{l}$
	Pipette de 5 à 100 ml
Portoirs	Portoir pour tubes de 50 ml, 15 ml, 5 ml, 1,5/2 ml
	Portoir pour barrette de tubes
	Portoir de 96 puits
	96S Super plaque magnétique, Alpaqua® UGS : A001322
	Aimant DynaMag™-2, Thermo Fisher, n° 12321D
	Récipients de congélation
Divers	Applicateur de film
	Chronomètre

\* L'équivalence doit être déterminée par l'utilisateur et l'utilisation d'autres dispositifs de thermocyclage est aux propres risques et périls de l'utilisateur.



## 8 Stockage et manipulation

### 8.1 Conditions d'expédition

Le produit sera expédié sur de la glace carbonique. Lors de son arrivée, vérifiez si la glace carbonique est toujours présente dans la boîte et si les réactifs sont congelés.

### 8.2 Précautions générales de manipulation



Vérifiez que la température et l'humidité à l'intérieur du laboratoire restent comprises entre 15 °C et 25 °C et entre 20 % et 85 % respectivement (pour réduire le risque de condensation/d'évaporation).

Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans les zones de laboratoire. Entretenez l'équipement conformément aux instructions du fabricant.

Décontaminez et mettez au rebut l'ensemble des réactifs, échantillons et consommables associés dans le respect des réglementations gouvernementales locales. Il est indispensable d'éviter toute contamination par de l'ADN étranger, provenant notamment de produits de PCR restés sur des plaques précédemment utilisées, afin que les résultats soient précis et reproductibles. Les produits amplifiés issus des précédentes expériences constituent la source la plus courante de contamination d'ADN.

Visuellement, les réactifs fournis sont d'aspect limpide et incolore, sauf pour la Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate qui contient du bleu de bromophénol dans tous les puits (couleur bleue). Si un changement quelconque de l'aspect du matériel ou une dégradation suspectée due à de mauvaises conditions de stockage survient et risque d'impacter les performances du test, adressez-vous à l'assistance technique (► chapitre 10 *Assistance technique*, page 50/58).

### 8.3 Avertissements et précautions

Ce produit ne contient aucune matière dangereuse.



Des fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles sur le site <https://sysmex-inostics.com/products/kit-specs/>.

En cas d'incident grave survenant en lien avec le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, cela doit être immédiatement signalé au fabricant et aux autorités compétentes de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient se situe.

#### 8.3.1 Mesures spécifiques

Mesures de premiers secours

- **Conseil général** : En cas d'effets persistants, consultez un médecin. Retirez immédiatement les chaussures et vêtements contaminés, puis lavez-les soigneusement avant de les réutiliser.
- **En cas d'inhalation** : Faites sortir la personne affectée de la pièce concernée. Veillez à aérer la pièce avec de l'air frais.
- **En cas de contact avec la peau** : Lavez la zone affectée avec du savon et beaucoup d'eau.
- **En cas de contact avec les yeux** : Retirez les lentilles de contact. Rincez l'œil abondamment à l'eau courante en gardant la paupière grande ouverte pendant au moins 10 à 15 minutes. Protégez l'œil non affecté.
- **En cas d'ingestion** : Appelez immédiatement un médecin. Ne provoquez pas de vomissement. Ne donnez jamais quelque chose à avaler à une personne inconsciente.

#### 8.3.2 Manipulation et stockage

Mesures générales de protection et d'hygiène

Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans le laboratoire. Assurez-vous d'employer la bonne technique de lavage des mains avant de partir. N'inhaliez pas de vapeurs. Évitez tout contact avec les yeux et la peau. Retirez immédiatement les vêtements salis ou imbibés.

### Précautions de manipulation sûre

Les risques lors de la manipulation des produits doivent être minimisés en adoptant les mesures de protection et les actions de prévention appropriées. Le processus de travail doit être conçu pour écarter le plus possible tout risque de contact avec la peau ou de libération de substances dangereuses.

### Conseils sur la protection contre l'incendie et l'explosion

Aucune mesure spéciale nécessaire.

### Conditions de stockage sécurisé, incompatibilités incluses



Conservez le récipient fermé hermétiquement dans un endroit sec et bien aéré. Les récipients ouverts doivent être refermés soigneusement et conservés à la verticale pour éviter toute fuite.

### 8.3.3 Précautions pour la manipulation de réactifs



Pour garantir une utilisation et mise au rebut appropriées des réactifs et pour éviter de contaminer les réactifs, suivez les précautions répertoriées ci-dessous :

- N'utilisez pas de réactifs dont la date d'expiration est dépassée ou qui n'ont pas été correctement stockés.
- Préparez les réactifs selon les instructions fournies.
- Les réactifs ne doivent être utilisés qu'avec les autres réactifs fournis dans le même kit.
- Il ne faut pas mélanger ou interchanger des réactifs de kits ou lots différents.
- Notez la date d'ouverture et marquez les tubes après chaque utilisation pour vous assurer que les réactifs ne sont pas utilisés au-delà de la date d'expiration ou du nombre recommandé de cycles de congélation-décongélation.
- Changez fréquemment de gants pour éviter toute contamination des réactifs. Changez systématiquement de gants entre deux manipulations de réactifs et d'échantillons.
- Éliminez les réactifs non utilisés et les déchets selon les réglementations nationales, fédérales, régionales et locales en vigueur.

### 8.3.4 Précautions de sécurité et prévention des contaminations



Suivez les précautions répertoriées ci-dessous afin d'éviter toute contamination d'ADN dans l'environnement de laboratoire et d'assurer la sécurité de l'ensemble du personnel :

- Séparez les espaces de travail utilisés pour la pré-PCR et la post-PCR et respectez un protocole unidirectionnel en procédant des zones « propres » (pré-amplification) vers les zones « sales » (post-amplification).
- Assurez-vous que l'équipement dédié (notamment les pipettes), les consommables, les réactifs, les récipients pour déchets dangereux et les manuels de laboratoires sont présents dans chaque zone de travail. N'échangez jamais ce matériel entre les zones pré-PCR et post-PCR. Nous recommandons d'utiliser un code couleur ou un étiquetage des équipements, consommables et réactifs afin d'identifier leur appartenance à une zone spécifique.
- Portez un équipement de protection individuelle approprié tout au long de la procédure.
  - Portez une blouse de laboratoire (jetable de préférence) et des gants jetables non poudrés à chaque fois que vous travaillez dans les zones pré-PCR et post-PCR.
  - Pour éviter toute contamination, changez fréquemment de gants entre les manipulations d'échantillons et de réactifs et après tout contact de l'extérieur des gants avec la peau.
  - Portez des lunettes de protection au moins pendant la préparation du plasma, l'extraction de l'ADN et la purification de produit PCR via QIAquick®.
  - Portez des sur-chaussures jetables ou changez de chaussures entre les laboratoires pré-PCR et post-PCR. Portez des protège-bras jetables (requis dans le laboratoire pré-PCR et recommandés dans le laboratoire post-PCR, en particulier pour la purification PCR avec IDU et PCR avec index).
- Lorsque vous sortez des zones de laboratoire pré-PCR et post-PCR, retirez et mettez au rebut l'équipement de protection individuelle.
- Manipulez tous les échantillons comme du matériel potentiellement infectieux. Si un produit se renverse, il est recommandé de

commencer par nettoyer la zone affectée avec un détergent/désinfectant et de l'eau, puis avec env. 0,5 % d'hypochlorite de sodium (eau de javel) préparé en utilisant de l'eau désionisée.

**Remarque :** *L'eau de javel ménagère vendue dans le commerce (par ex. de la marque Clorox) contient habituellement de l'hypochlorite de sodium à une concentration de 5,25 %. Diluer l'eau de javel domestique à un rapport de 1:10 vous donnera une solution d'hypochlorite de sodium à une concentration de 0,5 %.*

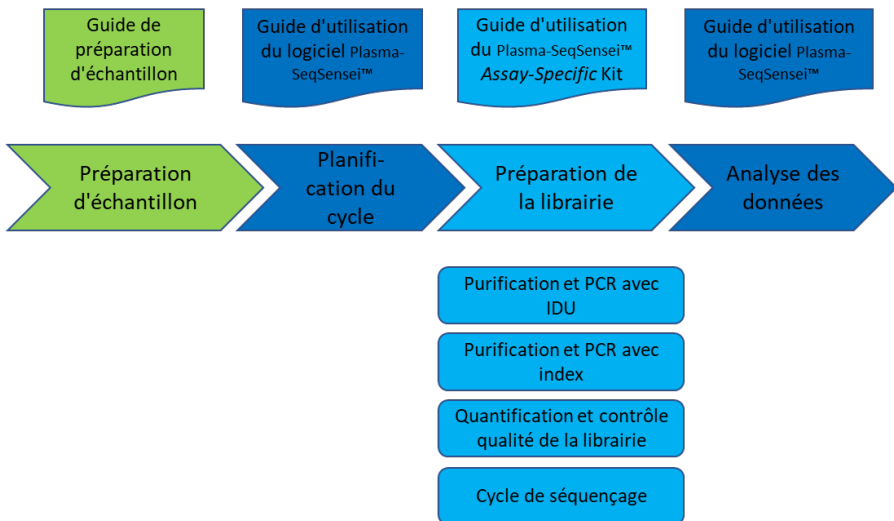
- Utilisez des cabines PCR dédiées pour les étapes de pipetage.
- Après utilisation, nettoyez les cabines PCR avec du désinfectant à base de composés quaternaires d'ammonium (comme du RHEOSEPT-WD Plus ou un équivalent), suivi d'un produit conçu pour éliminer les nucléases et acides nucléiques (comme du produit Roti® sans acides nucléiques ou un équivalent).
- Après utilisation, nettoyez les espaces de travail pour la PCR avec un produit conçu pour éliminer les nucléases et acides nucléiques (comme du produit Roti® sans acides nucléiques ou un équivalent).
- Décontaminez l'enceinte de sécurité, les espaces de travail pour la PCR et les matériels de laboratoire (pipettes, portoirs de tubes ou autre équipement) avec de la lumière ultraviolette (UV) après utilisation. Pour garantir l'efficacité des rayons UV, nettoyez régulièrement les résidus qui s'accumulent sur les ampoules UV.
- Utilisez exclusivement des embouts de pipette stériles, résistants aux aérosols, munis de filtres (sans ARNase, ADNase et apyrogènes, de lots certifiés).
- Utilisez exclusivement des réactifs et tubes adaptés à la PCR.
- N'ouvrez qu'un tube d'échantillon ou tube de réactif à la fois.
- Pour éviter la contamination des solutions de réactif à usage multiple, préparez des aliquots de travail conformément aux instructions et réduisez le pipetage direct.

## 9 Protocole

Le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit utilise du cfDNA quantifié issu du plasma afin de détecter le ctDNA. Avant de commencer le protocole de préparation de la librairie (Figure 4), comme décrit dans le présent guide d'utilisation, vérifiez que le protocole de préparation d'échantillon est exécuté comme décrit dans le guide de préparation d'échantillon de Sysmex Inostics.

En outre, la première partie du guide d'utilisation du logiciel Plasma-SeqSensei™ IVD, à savoir la planification du cycle, doit être effectuée. Si les échantillons doivent être dilués du fait que leur teneur en ADN est trop élevée, reportez-vous ► au chapitre 9.1 PCR avec IDU (PCR multiplexe), page 22/58, du présent guide d'utilisation.

La Figure 4 décrit le processus, notamment chacune des étapes du protocole, ainsi que le guide d'utilisation ou les consignes qu'il faut suivre pour l'intégralité du processus Plasma-SeqSensei™.



**Figure 4 : Processus Plasma-SeqSensei™, notamment les étapes du protocole et les documents requis.**



Chaque Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit est conçu pour analyser jusqu'à 16 échantillons sur une même plaque.

Si vous devez traiter plus de 16 échantillons sur le même cycle de séquençage, vous devez vous procurer un deuxième Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit ainsi qu'un Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit.

Pour les échantillons sur la deuxième plaque (échantillons 17 à 32), utilisez la Index Primer Plate **IND35 (Plaque B)** du Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit au lieu de la Index Primer Plate IND34 (Plaque A) du Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit d'origine.



**Avertissement :** Lorsque la même Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate (par ex. IND34) est utilisée deux fois sur le même cycle, les résultats ne seront pas analysables.

Si deux plaques doivent être utilisées, préparez toujours une seule plaque à la fois pour chaque étape du protocole avant de commencer avec l'autre plaque. Chaque plaque contient un témoin positif (Positive Control, PC) et un témoin négatif (No Template Control, NTC).

**Remarque :** Utilisez toujours le kit de séquençage le plus petit possible. Le NextSeq™ High Output kit v2.5 ne peut être utilisé qu'avec 5 échantillons ou plus.

## 9.1 PCR avec IDU (PCR multiplexe)

Dans le cadre d'une PCR multiplexe avec IDU, toutes les régions cibles sont co-amplifiées lors de l'introduction de séquences de code-barres moléculaire unique. Les IDU permettent de réduire considérablement le bruit de fond et donc d'obtenir une sensibilité très élevée de la technologie Plasma-SeqSensei™.

Pour le Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit, les échantillons avec une entrée d'ADN comprise entre 4,3 et 86 ng/116 µl peuvent être analysés. Les échantillons avec une teneur en ADN supérieure doivent être dilués. Les échantillons avec moins de 4,3 ng/116 µl n'ont pas été validés et donneront des résultats non valides.

**Remarque :** La mesure Qubit des échantillons représente une estimation grossière de l'ADN entrant afin de déterminer la charge de l'échantillon. La quantification finale et probablement différente des échantillons se produira pendant le séquençage de la bibliothèque à l'aide d'un quantificateur interne (Quantispike).

**Recommandation :** *Pour obtenir des résultats optimaux, nous recommandons une teneur en ADN de 43 ng/116 µl par échantillon, dans la mesure du possible, même pour des échantillons de 86 ng/116 µl ou moins.*

Kits et réactifs nécessaires :

- **Breast Cancer Mpx A** (bouchon bleu), Sysmex Inostics, n° ZR851013
- **Breast Cancer Mpx B** (bouchon jaune), Sysmex Inostics, n° ZR851014
- **Breast Cancer Positive Control** (bouchon rouge), Sysmex Inostics, n° ZR855006
- **No Template Control** (bouchon transparent), Sysmex Inostics, n° ZR854002
- **Quantispike** (bouchon vert), Sysmex Inostics, n° ZR856001
- **PCR Master Mix v2, x2** (bouchon noir), Sysmex Inostics, n° ZR850001

Les étapes suivantes sont effectuées dans la zone de préparation d'échantillon du laboratoire pré-PCR.

Préparation :

- Tous les témoins, échantillons d'ADN et réactifs congelés :
  - Décongeler
  - Mélanger au vortex pendant 5 s
  - Centrifuger pendant 2 s
- Vérifiez la teneur totale en ADN des échantillons.  
Si la teneur totale en ADN est trop élevée (par exemple, > 86 ng/116 µl), diluez l'échantillon conformément au calcul ci-dessous.
- Étiquetez les tubes LoBind® de 1,5 ml pour tous les échantillons nécessitant une dilution.
- Étiquetez clairement les barrettes de tubes d'échantillons conformément à la disposition des plaques.

Dilution de l'ADN :

Si la concentration en ADN dépasse la teneur maximale de 86 ng/116 µl ou est proche de la limite supérieure, nous recommandons de préparer un nouveau tube avec un échantillon dilué à **43 ng/116 µl** selon les calculs suivants :



$$\text{Facteur de dilution} = \frac{\text{Concentration mesurée en ng/116 } \mu\text{l}}{43 \text{ ng/116 } \mu\text{l}}$$

$$\text{Volume d'éluat nécessaire } [\mu\text{l}] = \frac{135 \mu\text{l}}{\text{Facteur de dilution}}$$

Avec un volume total de 135  $\mu\text{l}$  (pour plus de détails, reportez-vous ► au chapitre 4.2 Purification de l'ADN circulant extrait du plasma dans le guide de préparation d'échantillon)

$$\text{Volume de tampon AVE } [\mu\text{l}] = 135 \mu\text{l} - \text{Volume d'éluat nécessaire}$$

$$\begin{aligned} \text{Échantillon dilué [135 } \mu\text{l}] \\ = \text{volume d'éluat nécessaire} + \text{volume de tampon AVE} \end{aligned}$$

**Remarque :** Le tampon AVE pour la dilution de l'échantillon fait partie du QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN) (pour plus de détails, voir ► chapitre 4.2 Purification de l'ADN circulant extrait du plasma du guide de préparation d'échantillon).

### Nouvelle quantification des échantillons dilués

Pour les échantillons dilués, quantifiez à nouveau les dilutions à l'aide du Qubit™ conformément au ► chapitre 4.3 Quantification des échantillons (Qubit™) du guide de préparation d'échantillon.

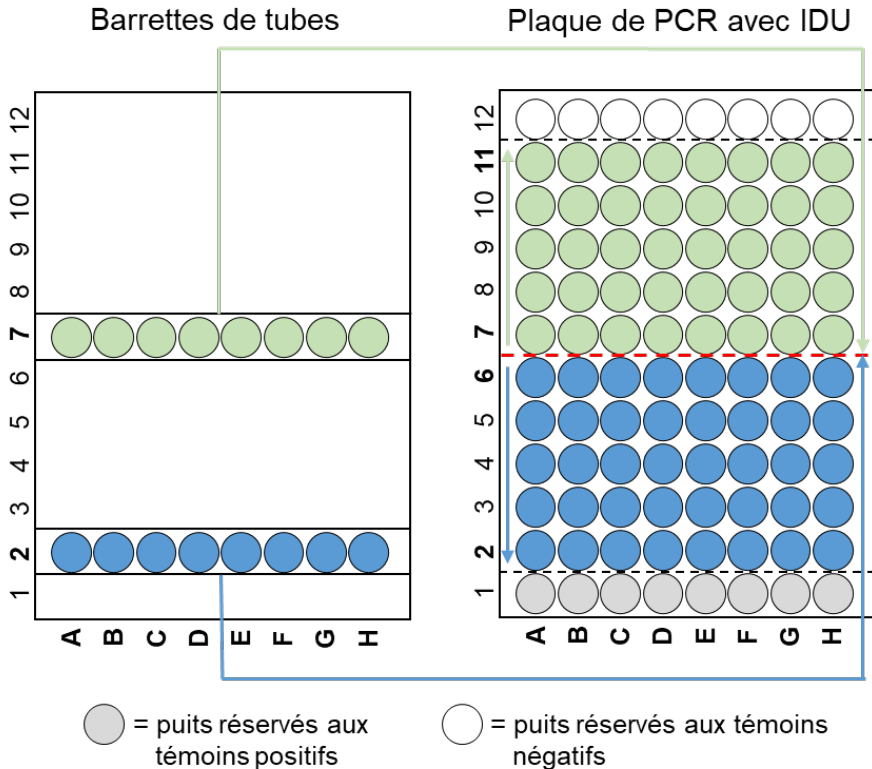
### Configuration de PCR avec IDU :

**Remarque :** L'ADN isolé de l'échantillon de plasma est soumis à une PCR multiplexe dans 5 réplicats/puits. Les témoins positif et négatifs sont analysés dans des réplicats uniques (colonnes 1 et 12).

**Remarque :** Les échantillons sont ajoutés sur la plaque de PCR avec IDU, colonne par colonne, en utilisant une pipette multi-canaux, comme indiqué sur la Figure 5 (pour éviter toute contamination). Les barrettes de tubes d'échantillons doivent être disposées parallèlement à la plaque de PCR avec IDU.

**Remarque :** Évitez de mélanger les échantillons pendant le protocole.

**Remarque :** Si vous traitez plus de 16 échantillons, effectuez toujours la configuration de PCR avec IDU pour une seule plaque à la fois.



**Figure 5 : Processus de pipetage utilisé lors du pipetage des barrettes de tubes vers une plaque de PCR avec IDU**

1. Préparez chaque solution de mix pour PCR avec IDU par plaque conformément au Tableau 8 : « Solution de mix pour PCR avec IDU ». Mélangez en pipetant 10 fois de haut en bas en utilisant une pipette monocanal. Le volume requis de solution de mix pour PCR avec IDU pour le témoin positif et le témoin négatif est comptabilisé dans les calculs (reportez-vous au Tableau 8).

**Tableau 8 : Processus de pipetage de la solution de mix pour PCR avec IDU pour chaque plaque**

Nombre d'échantillons (1 échantillon = 5 réplicats), avec 15 % d'excédent	2	3	4	5	6	7	8	9
PCR Master Mix v2, x2 [µl]	400	567	734	900	1 067	1 234	1 401	1 567
Breast Cancer Mpx A [µl]	39	55	71	87	103	119	135	151
Breast Cancer Mpx B [µl]	39	55	71	87	103	119	135	151
Quantispike [µl]	3,0	4,3	5,6	6,8	8,1	9,4	10,6	11,9
Volume final (somme)	481,0	681,3	881,6	1 080,8	1 281,1	1 481,4	1 681,6	1 880,9

Nombre d'échantillons (1 échantillon = 5 réplicats), avec 15 % d'excédent	10	11	12	13	14	15	16
PCR Master Mix v2, x2 [µl]	1 734	1 901	2 068	2 234	2 401	2 568	2 735
Breast Cancer Mpx A [µl]	167	183	199	215	231	247	263
Breast Cancer Mpx B [µl]	167	183	199	215	231	247	263
Quantispike [µl]	13,2	14,4	15,7	17,0	18,2	19,5	20,7
Volume final (somme)	2 081,2	2 281,4	2 481,7	2 681,0	2 881,2	3 081,5	3 281,7

**Remarque :** Le volume pour un témoin positif et un témoin négatif est déjà inclus.

- Ajoutez 34,8 µl de solution de mix pour PCR avec IDU dans les puits sur les colonnes 1 et 12, conformément à la disposition des plaques.
- Ajoutez 23,2 µl de témoin positif dans le puits sur la colonne 1 conformément à la disposition des plaques, puis mélangez le témoin positif en pipetant 10 fois de haut en bas.

Ajoutez 23,2 µl de témoin négatif dans le puits sur la colonne 12 conformément à la disposition des plaques, puis mélangez le témoin négatif en pipetant 10 fois de haut en bas.

- Aliquotez 187,5 µl de solution de mix pour PCR avec IDU pour chaque échantillon dans une barrette de tubes.
- Ajoutez 125 µl d'échantillon dans le tube correspondant de la barrette de tubes, puis mélangez en pipetant 10 fois de haut en bas.

6. À l'aide de la pipette multi-canaux de 200 µl, aliquotez 58 µl d'échantillon et de solution de mix dans 5 puits, conformément à la disposition des plaques.
7. Scellez la plaque à l'aide de film PCR adhésif et centrifugez à 1 000 x g pendant 5 s.
8. Déposez la plaque dans un thermocycleur PCR. Démarrez le thermocycleur, connectez-vous et lancez le programme de cyclage intitulé « UID BC\_v1 » (Tableau 9) dans un délai de 15 minutes.

**Tableau 9 : Profil Tt de UID BC\_v1**

Thermocycleur PCR : Veriti

Réglage de volume : 50 µl

<input checked="" type="checkbox"/> Couvercle chauffant		Température du couvercle 96 °C		
N°	T [°C]	Temps [mm:ss]	Voir le n°	N° de cycles
1	98	02:00	N.D.	1
2	98	00:20	N.D.	13
3	63	01:30	N.D.	13
4	72	00:10	2	13
5	72	02:10	N.D.	1
6	4	∞	N.D.	1

9. Si vous traitez plus de 16 échantillons, répétez la procédure de PCR avec IDU en utilisant une deuxième plaque de PCR avec IDU, en commençant à l'étape 1.
10. Stockez la plaque de PCR avec IDU dans le laboratoire post-PCR à une température comprise entre 2 °C et 8 °C jusqu'à 14 jours, entre -15 °C et -30 °C jusqu'à 2 mois ou procédez directement à la purification PCR avec IDU (► chapitre 9.2 *Purification PCR avec IDU*, page 28/58).

## 9.2 Purification PCR avec IDU

L'Agencourt AMPure® XP Kit est utilisé pour retirer les amorces en excès, lesquelles interféreraient lors de la prochaine PCR avec index.

Kits et réactifs nécessaires :

- **Agencourt AMPure® XP**, Beckman Coulter, n° A63881
- **Buffer EB** (tampon d'éluion), QIAGEN, n° 19086
- **Éthanol** (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.
- **RNase- and DNase-free distilled water**

Les étapes suivantes sont effectuées dans le laboratoire post-PCR.

Préparation :

- Si la plaque a été stockée à une température comprise entre 2 °C et 8 °C, exécutez le programme de PCR intitulé « Remove Condensate\_v1 » (Tableau 10).

**Tableau 10 : Profil Tt du Remove Condensate\_v1**

Thermocycleur PCR : Veriti

Réglage de volume : 50 µl

Couvercle chauffant                      Température du couvercle                      105 °C

N°	T [°C]	Temps [mm:ss]	Voir le n°	N° de cycles
1	4	02:00	N.D.	1

- Avant de retirer le scellement, centrifugez la plaque à 1 000 x g pendant 5 s.
- Prévoyez un bac pour les déchets liquides.
- Préparez de l'EtOH à 70 % frais (Tableau 11). Retournez 10 fois le tube.

**Recommandation :** *Préparez de l'EtOH à 70 % pendant l'incubation à l'étape 3 de la procédure de purification.*

**Tableau 11 : Préparation de l'EtOH à 70 %**

	Demi-plaque (8 échantillons)	Plaque complète (16 échantillons)
EtOH ( $\geq 99,8$ %, p.a.)	9,1 ml	17,5 ml
Eau distillée	3,9 ml	7,5 ml
Total	13 ml	25 ml

- Équilibrez les billes entre 15 °C et 25 °C (~30 minutes) et remettez-les en suspension en faisant rouler le flacon à l'horizontale sur la surface de travail. Faites-le rouler lentement, faites une pause après chaque rotation de 180 degrés, puis patientez jusqu'à ce que le liquide retombe. Recommencez jusqu'à ce que les billes soient remises en suspension de manière homogène et qu'il ne reste aucune trace visible. De temps en temps, retournez le flacon. Ne mélangez pas le flacon de billes au vortex.
- Ajoutez de la solution de billes AMPure® (Tableau 12) dans un réservoir en utilisant une pipette de 1 ml.

**Tableau 12 : Volume requis de billes AMPure®**

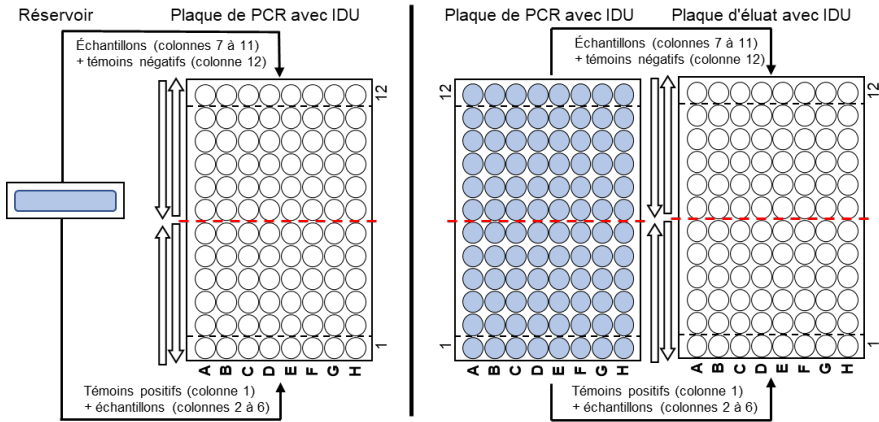
Demi-plaque (8 échantillons)	Plaque complète (16 échantillons)
4,4 ml	8,3 ml

- Si deux plaques de PCR avec IDU doivent être utilisées, effectuez toujours le protocole de purification PCR avec IDU pour une seule plaque à la fois.

**Procédure de purification :**

1. Utilisez une pipette multi-canaux pour les étapes suivantes. Les plaques PCR avec IDU et d'éluat avec IDU doivent être disposées parallèlement entre elles et le pipetage est effectué par colonne (et non par ligne, Figure 6).

**Remarque :** *Effectuez toutes les étapes en pipetant de gauche à droite.*



**Figure 6 : Le processus de pipetage utilisé lors du pipetage du réservoir vers la plaque de PCR avec IDU (gauche) ou vers la plaque de PCR avec IDU (droite) dans une plaque d'éluat avec IDU.**

2. Ajoutez 81  $\mu\text{l}$  de billes AMPure® dans chaque puits de la plaque de PCR avec IDU, mélangez en pipetant lentement 10 fois de haut en bas.

**Remarque :** Remettez 3 fois les billes AMPure® en suspension dans le réservoir avant chaque aspiration.

**Remarque :** Assurez-vous que les billes ne s'assèchent jamais.

3. Faites incuber la plaque de PCR avec IDU entre 15 °C et 25 °C pendant 10 minutes.
4. Déposez la plaque de PCR avec IDU sur la plaque magnétique (Alpaqua) et faites-la incuber pendant 5 minutes.
5. Assurez-vous que toutes les billes sont liées à l'aimant. Retirez prudemment le surnageant en pipetant 134  $\mu\text{l}$ .

**Remarque :** Ne perturbez pas l'anneau des billes magnétiques séparées. Descendez la pointe de la pipette jusqu'au fond du puits sans toucher la paroi.

6. Transférez l'EtOH à 70 % dans un réservoir (Tableau 13).

**Tableau 13 : Volume requis d'EtOH à 70 %**

Demi-plaque (8 échantillons)	Plaque complète (16 échantillons)
13 ml	25 ml

- Ajoutez 100 µl d'EtOH à 70 % dans chaque puits sans remise en suspension. Mettez en incubation pendant 30 s.
- Laissez la plaque sur l'aimant. Retirez prudemment et jetez 110 µl d'EtOH.
- Ajoutez 100 µl d'EtOH à 70 % dans chaque puits sans remise en suspension. Mettez en incubation pendant 30 s.
- Laissez la plaque sur l'aimant. Retirez prudemment et jetez 100 µl d'EtOH.
- Retirez le restant d'EtOH à l'aide de la pipette multicanaux de 20 µl.
- Retirez la plaque de PCR avec IDU de l'aimant et laissez-la sécher pendant 2 minutes.
- Ajoutez le volume requis de tampon Buffer EB dans un réservoir (Tableau 14).

**Tableau 14 : Volume requis de tampon Buffer EB**

Demi-plaque (8 échantillons)	Plaque complète (16 échantillons)
7 ml	13 ml

- Ajoutez 120 µl de tampon Buffer EB dans chaque puits pour éluer l'ADN, puis mélangez au moins 10 fois de haut en bas en procédant prudemment.
- Vérifiez visuellement que toutes les billes sont en solution.
- Faites incuber la plaque de PCR avec IDU pendant 2 minutes entre 15 °C et 25 °C.
- Déposez la plaque de PCR avec IDU sur l'aimant et faites-la incuber pendant 1 minute.
- Transférez prudemment 110 µl d'éluat de chaque puits dans une nouvelle plaque d'éluat avec IDU, puis jetez la plaque de PCR avec IDU.



19. Procédez directement à la PCR avec index ou scellez la plaque d'éluat avec IDU. Stockez-la à une température comprise entre 2 °C et 8 °C jusqu'à 7 jours, ou entre -15 °C et -30 °C jusqu'à 2 mois.
20. Si vous traitez plus de 16 échantillons, répétez la procédure de purification PCR avec IDU en utilisant la deuxième plaque de PCR avec IDU, en commençant à l'étape 2.

### 9.3 PCR avec index

La PCR avec index est effectuée pour amplifier des produits purifiés de PCR avec IDU lors de l'introduction d'étiquettes d'indexage (code-barres de puits) et d'adaptateurs de séquençage Illumina.

Chaque Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit est fourni avec une Index Primer Plate IND34 (Plaque A) pour 16 échantillons maximum. Si vous analysez plus de 16 échantillons sur un même cycle de séquençage, vous devez utiliser une deuxième Index Primer Plate IND35 (Plaque B) du Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit.

**Remarque :** *N'utilisez pas la même Index Primer Plate deux fois sur le même cycle de séquençage. Utilisez toujours deux Index Primer Plates différentes (IND34 + IND35 / Plaque A + Plaque B).*

Les puits des Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plates sont à usage unique.

Les positions des Index Primer Plates séchées doivent correspondre à celles sur la plaque de PCR finale, ainsi qu'à celles sur la disposition des plaques sur l'outil de planification du cycle du logiciel Plasma-SeqSensei™ IVD (Figure 7). Veuillez noter les puits qui sont déjà utilisés. Lors de la planification du cycle suivant, utilisez les puits/positions d'index restants et transférez les informations sur le logiciel.

Plate A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	PC	Sample1				Sample2				NTC			
B		Sample3				Sample4							
C		Sample5				Sample6							
D		Sample7				Sample8							
E													
F													
G													
H													

Figure 7 : Exemple de disposition des plaques pour la PCR avec index

Kits et réactifs nécessaires :

- **Index Primer Plate IND34** (Plaque A), Sysmex Inostics, n° ZR852004
- *Facultatif* : **Index Primer Plate IND35** (Plaque B), Sysmex Inostics, n° ZR852005
- **PCR Master Mix v2, x2** (bouchon noir), Sysmex Inostics, n° ZR850001
- **Water, nuclease-free** (bouchon blanc/transparent), Sysmex Inostics, n° ZR224006
- **Buffer EB** (tampon d'élution), QIAGEN, n° 19086

Les étapes suivantes sont effectuées dans le laboratoire post-PCR.

Préparation :

- Prévoyez tous les réactifs :
  - Décongeler
  - Mélanger au vortex pendant 5 s
  - Centrifuger pendant 2 s
- Étiquetez tous les accessoires requis en plastique (tube de solution de mix pour PCR avec index, réservoir jetable, plaque DIL, plaque de PCR avec index).
- Placez le tampon Buffer EB (Tableau 15) requis dans un réservoir et recouvrez jusqu'à utilisation.

Tableau 15 : Volume requis de tampon Buffer EB

Demi-plaque (8 échantillons)	Plaque complète (16 échantillons)
5,5 ml	10 ml

- Si la plaque a été stockée à une température comprise entre 2 °C et 8 °C, effectuez le programme de PCR intitulé « Remove Condensate\_v1 ».
- Si la plaque d'éluat avec IDU a été stockée, centrifugez-la à 1 000 x g pendant 5 s.
- Si vous traitez deux plaques d'éluat avec IDU, effectuez toujours le protocole de PCR avec index pour une seule plaque à la fois.

Préparation de la plaque de dilution (DIL) :

**Remarque :** *Utilisez une pipette multi-canaux pour toutes les étapes de préparation de la plaque DIL.*

**Remarque :** *Si la plaque a été stockée, mélangez chaque puits de la plaque d'éluat avec IDU en pipetant 5 fois de haut en bas.*

1. Déposez la plaque d'éluat avec IDU sur l'aimant et faites-la incuber pendant 1 minute.
2. Ajoutez 99 µl de tampon Buffer EB par puits de la plaque DIL, selon la configuration de la plaque.
3. Transférez 5 µl par puits de la plaque d'éluat avec IDU vers la plaque DIL, rincez la pointe de la pipette en pipetant 3 fois de haut en bas.
4. Mélangez soigneusement en pipetant 70 µl 10 fois de haut en bas.
5. Scellez la plaque d'éluat avec IDU. Stockez la plaque avec le volume résiduel à une température comprise entre 2 °C et 8 °C jusqu'à 7 jours, ou entre -15 °C et -30 °C jusqu'à 2 mois.

Préparation de la Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate :

6. Centrifugez la Index Primer Plate à 1 000 x g pendant 5 s.
7. Préparez la quantité requise de puits pour la Index Primer Plate en perçant le papier aluminium avec des pointes de pipettes de 200 µl.

**Remarque :** *Vérifiez si la bonne Index Primer Plate (IND34 ou IND35 / A ou B) a été utilisée dans la bonne orientation.*

### Préparation de la PCR avec index :

8. Préparez une solution de mix pour PCR avec index conformément au Tableau 16. Mélangez au vortex pendant 5 s et centrifugez pendant 2 s.

**Tableau 16 : Processus de pipetage de la solution de mix pour PCR avec index pour chaque plaque**

Nombre d'échantillons avec 10 % d'excédent	2	3	4	5	6	7	8	9
PCR Master Mix v2, x2 [µl]	165	234	303	371	440	509	578	646
Water, nuclease-free [µl]	99	140	181	223	264	305	347	388
Volume final (somme)	264	374	484	594	704	814	925	1 034

Nombre d'échantillons avec 10 % d'excédent	10	11	12	13	14	15	16
PCR Master Mix v2, x2 [µl]	715	784	853	921	990	1 059	1 128
Water, nuclease-free [µl]	429	470	512	553	594	635	677
Volume final (somme)	1 144	1 254	1 365	1 474	1 584	1 694	1 805

**Remarque :** Le volume pour un témoin positif et un témoin négatif est déjà inclus.

9. Ajoutez 20 µl de solution de mix pour PCR avec index pour chaque puits dans la Index Primer Plate.

**Recommandation :** *Transférez la solution de mix sur les barrettes de tubes à l'aide d'une pipette multi-canaux pour le transfert sur une plaque. Veillez à utiliser des embouts de pipette neufs à chaque fois.*

10. Ajoutez 5 µl de témoin de la plaque DIL sur la Index Primer Plate, puis mélangez soigneusement en pipetant 10 fois de haut en bas, jusqu'à ce que les réactifs soient remis en suspension. Utilisez une pipette multi-canaux. Après utilisation, jetez la plaque DIL.

**Remarque :** *Vérifiez visuellement la bonne orientation de la plaque DIL et de la Plasma-SeqSensei™\_Index Primer Plate, afin d'éviter de mélanger les échantillons.*

**Remarque :** *Vérifiez si des points bleus sont visibles au fond des puits après la remise en suspension. Un point bleu indique que les*

*réactifs ont été mal remis en suspension. Si des points bleus sont toujours visibles, recommencez la remise en suspension en pipetant 10 fois de haut en bas, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de points bleus visible et que le liquide soit devenu bleu.*

11. Scellez la Index Primer Plate à l'aide de film PCR adhésif et centrifugez à 1 000 x g pendant 5 s.
12. Si vous n'utilisez qu'une partie de la Index Primer Plate, transférez tout le volume de la Index Primer Plate dans une nouvelle plaque de PCR.

**Remarque :** Vérifiez la bonne orientation de la Plasma-SeqSense™ Index Primer Plate et de la nouvelle plaque de PCR, afin d'éviter de mélanger les échantillons.

**Recommandation :** Utilisez 2 pipettes multi-canaux de 20 µl au lieu de 1 pipette multi-canaux de 200 µl.

13. Scellez la nouvelle plaque de PCR à l'aide de film PCR adhésif et centrifugez à 1 000 x g pendant 5 s.
14. Scellez les puits utilisés de la Index Primer Plate (uniquement applicable si la Index Primer Plate ne sera pas jetée) et stockez-la à une température comprise entre 2 °C et 8 °C dans l'obscurité.
15. Démarrez la PCR avec le programme intitulé « IDX BC\_v1 » (Tableau 17) dans un délai de 15 minutes.

### Tableau 17 : Profil Tt de IDX BC\_v1

Thermocycleur PCR : Veriti

Réglage de volume : 25 µl

Couvercle chauffant      Température du couvercle : 96 °C

N°	T [°C]	Temps [mm:ss]	Voir le n°	N° de cycles
1	98	00:30	N.D.	1
2	98	00:10	N.D.	20
3	65	00:10	N.D.	20
4	72	00:10	2	20
5	72	05:00	N.D.	1
6	4	∞	N.D.	1

16. Si vous traitez plus de 16 échantillons, répétez la procédure de PCR avec index en utilisant la deuxième plaque d'éluat avec IDU, en commençant à l'étape 1.
17. Après la PCR, centrifugez les plaques de PCR avec index à 1 000 x g pendant 5 s. Stockez les plaques à une température comprise entre 2 °C et 8 °C jusqu'à 7 jours, entre -15 °C et -30 °C jusqu'à 2 mois, ou procédez directement à la purification PCR avec index.

### 9.4 Purification PCR avec index

**Important :** Cette étape combine **tous les puits d'échantillons et de témoins d'une même plaque dans une même librairie**. Si deux plaques ont été préparées (IND34 et IND35 / Plaque A et Plaque B), combinez uniquement les échantillons et témoins de **l'une des plaques**, afin d'obtenir deux librairies de séquençage. En outre, la purification élimine les désoxyribonucléotides triphosphates, les amorces, les dimères d'amorce et les sels qui altéreraient le prochain séquençage.

Kits et réactifs nécessaires :

- **Agencourt AMPure® XP**, Beckman Coulter, A63881
- **QIAquick® PCR Purification Kit**, QIAGEN, n° 28104 ou n° 28106
- **Buffer PB**, QIAGEN, n° 19066
- **Éthanol (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.**
- **RNase- and DNase-free distilled water**

**Les étapes suivantes sont effectuées dans le laboratoire post-PCR.**

Préparation :

- Si la plaque a été stockée à une température comprise entre 2 °C et 8 °C, exécutez le programme de PCR intitulé « Remove Condensate\_v1 ».
- Étiquetez tous les accessoires requis en plastique (tube de dilution EtOH, tube(s) de dilution PB, colonne(s) de centrifugation, tube(s) d'éluat QIAquick®, tube(s) d'éluat d'index).
- Préparez un bac pour les déchets liquides.

- Préparez de l'EtOH à 70 % frais, conformément au Tableau 18. Retournez 10 fois.

**Tableau 18 : Préparation de l'EtOH à 70 %**

Réactif	Volume
EtOH ≥ 99,8 %, p.a. [ml]	2,8
Eau distillée [ml]	1,2
Volume nécessaire [ml]	4,0

- Avant de retirer le scellement, centrifugez la plaque de PCR avec index à 1 000 x g pendant 5 s.
- Recueillez l'intégralité du liquide de **l'ensemble des puits (échantillons et témoins) d'une même plaque** en pipettant 2 x 15 µl dans un récipient approprié à l'aide d'une pipette de 20 µl

**Remarque :** *Si vous utilisez une pipette multi-canaux, mélangez d'abord tous les puits par colonne sur une même ligne d'une nouvelle barrette de plaque de PCR. Ensuite, transférez le contenu de chaque puits dans un récipient approprié à l'aide d'une pipette monocanal.*

- Si deux plaques de PCR avec index doivent être utilisées, effectuez toujours la purification PCR avec index pour une seule plaque à la fois.

**Remarque :** *Utilisez une pipette monocanal pour les étapes suivantes de ce protocole.*

#### 1<sup>ère</sup> purification avec QIAquick® :

1. Pour la purification avec le QIAquick® PCR Purification Kit, reportez-vous au protocole « QIAquick PCR Purification using a Vacuum Manifold » dans le manuel du fabricant. Les anomalies de manipulation sont décrites ci-dessous.
2. Tout d'abord, ajoutez le volume calculé (reportez-vous au Tableau 19) du tampon Buffer PB dans le tube respectif, mélangez-le au vortex pendant 3 s et centrifugez-le à 500 x g pendant 2 s.

**Tableau 19 : Calcul du volume requis de tampon Buffer PB**

Réactif	Par puits	___ x puits
Volume d'échantillon [ $\mu$ l]	25	
Tampon Buffer PB [ $\mu$ l]	125	
Volume total [ $\mu$ l]	150	

- Effectuez les étapes suivantes de purification PCR, conformément aux instructions décrites dans le manuel de QIAGEN.

**Remarque :** *Le volume de chargement maximal pour la colonne est de 800  $\mu$ l. Pour les volumes d'échantillons mélangés supérieurs à 800  $\mu$ l, utilisez un tube d'extension ou rechargez.*

**Remarque :** *Vérifiez visuellement à chaque étape que le volume adéquat est appliqué dans la colonne et que tout le liquide est passé à travers le filtre.*

**Remarque :** *En cas d'obstruction des colonnes, reportez-vous au guide de résolution des problèmes dans le manuel de QIAGEN.*

- Pour l'éluat d'ADN, placez une colonne QIAquick® dans un tube LoBind® propre de 1,5 ml.
- Ajoutez 50  $\mu$ l de tampon Buffer EB au centre de la membre QIAquick® et faites incubez pendant 1 minute entre 15 °C et 25 °C avant d'effectuer la dernière étape de centrifugation.

**Remarque :** *N'éluiez pas deux fois.*

#### 2ème purification avec billes AMPure® :

- Transférez 45  $\mu$ l d'éluat dans un nouveau tube LoBind®. Jetez le tube précédent.
- A) Lorsque vous utilisez le flacon AMPure®, laissez les billes s'équilibrer entre 15 °C et 25 °C (~30 minutes) et remettez-les en suspension en faisant rouler le flacon à l'horizontale sur la surface de travail. Faites-le rouler lentement, faites une pause après une rotation de 180 degrés, puis patientez jusqu'à ce que le liquide retombe. Recommencez jusqu'à ce que les billes soient remises en suspension de manière homogène.



B) Lorsque vous utilisez des aliquots de billes AMPure®, laissez-les s'équilibrer entre 15 °C et 25 °C, puis mélangez les billes en les inversant au moins 10 fois. Assurez-vous que les billes sont complètement remises en suspension.

8. Ajoutez 40 µl de billes AMPure® dans l'éluat, mélangez au vortex pendant 10 s et centrifugez pendant 3 s.
9. Incubez entre 15 °C et 25 °C pendant 5 minutes.
10. Ouvrez le tube, placez-le dans le DynaMag-2 et faites incuber pendant 2 minutes entre 15 °C et 25 °C.

Les étapes suivantes (11 à 15) sont réalisées alors que les tubes se trouvent dans le portoir magnétique :

11. À l'aide d'une pipette de 200 µl, réglée à 100 µl, retirez le surnageant et jetez-le.

**Remarque :** *Soulevez le tube d'environ 1 cm et pressez le fond complètement contre l'aimant pour vous assurer que toutes les billes sont fixées.*

12. Ajoutez 500 µl d'EtOH à 70 % et faites incuber pendant 30 s entre 15 °C et 25 °C.
13. Retirez le surnageant et jetez-le.
14. Ajoutez 500 µl d'EtOH à 70 % et faites incuber pendant 30 s entre 15 °C et 25 °C. Pendant l'incubation, faites tourner le tube de 180 degrés autour de l'axe vertical pour garantir un mélange efficace. Retournez-le lentement en position initiale au plus tôt après 5 s.
15. Retirez tout le surnageant et jetez-le. Retirez le restant d'EtOH à l'aide de la pipette de 20 µl.
16. Retirez le tube du DynaMag-2 et laissez-le sécher pendant 2 minutes entre 15 °C et 25 °C avec le couvercle ouvert.
17. Ajoutez 15 µl de tampon Buffer EB et remettez complètement en suspension le mélange de billes en mélangeant au vortex pendant 10 s. Centrifugez pendant 3 s et faites incuber pendant 1 minute entre 15 °C et 25 °C.

18. Ouvrez le tube, placez-le dans le DynaMag-2 et faites incuber pendant 1 minute entre 15 °C et 25 °C.
19. À l'aide d'une pipette de 20 µl, réglée à 20 µl pour transférer tout le surnageant dans le tube « Éluat d'index ».  
**Remarque :** *Soulevez le tube d'environ 1 cm et pressez le fond complètement contre l'aimant pour vous assurer que toutes les billes sont fixées.*
20. Jetez le tube étiqueté avec la mention « Éluat QIAquick® ».
21. Stockez le tube « Éluat d'index » à une température comprise entre 2 °C et 8 °C jusqu'à 7 jours, entre -15 °C et -30 °C jusqu'à 2 mois, ou procédez directement à la quantification de Bioanalyzer.
22. Si vous traitez plus de 16 échantillons, répétez la procédure de purification PCR avec index en utilisant la deuxième plaque de PCR avec index, en commençant à l'étape 2.

### 9.5 Contrôle qualité de la librairie (Bioanalyzer)

Le contrôle qualité de la librairie est réalisé à l'aide d'un Bioanalyzer afin de vérifier les produits secondaires de chaque librairie et de déterminer la taille moyenne. Pour chaque librairie, les quantifications doivent être réalisées en trois réplicats.

Le Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit a été développé en utilisant le Bioanalyzer DNA 1000 Kit d'Agilent.

Kits et réactifs nécessaires :

- **DNA 1000 Kit**, Agilent, n° 5067-1504
- **Buffer EB** (tampon d'éluion), QIAGEN, n° 19086
- **RNase- and DNase-free distilled water**

**Les étapes suivantes sont effectuées dans le laboratoire post-PCR.**

Préparation du Bioanalyzer :

Laissez les réactifs s'équilibrer entre 15 °C et 25 °C pendant 30 minutes dans l'obscurité.

Pour toutes les étapes, reportez-vous au manuel du Bioanalyzer d'Agilent.

**Remarque :** *La mesure de l'échantillon doit être réalisée en trois réplicats techniques.*

## Préparation de la dilution du Bioanalyzer (BA\_DIL) :

1. Calculer les **volumes requis pour la BA\_DIL** :

$$\text{Facteur de dilution} = \frac{\text{Quantité totale d'ADN}}{43}$$

avec la quantité totale d'ADN de tous les échantillons analysés en ng/116µl + 4,3 ng pour chaque Positive Control (PC).

(mesurés avec Qubit™ ; reportez-vous ► au chapitre 4.3 Quantification des échantillons (Qubit™) du guide de préparation d'échantillon)

**Remarque :** *Si le facteur de dilution est < 1, ne diluez pas votre éluat avec index, mais utilisez-le directement pour les mesures QC, la quantification et la dilution 2 nM.*

$$\text{Buffer EB } [\mu\text{L}] = (3 * \text{facteur de dilution}) - 3 \mu\text{l}$$

$$\text{BA\_DIL } [\mu\text{L}] = 3 \mu\text{l d'éluat d'index} + X \mu\text{l Buffer EB}$$

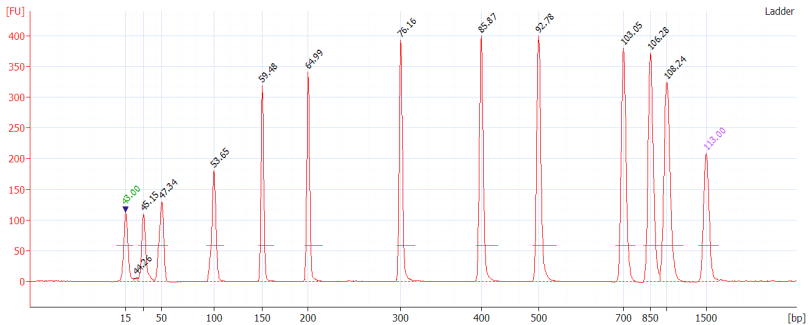
2. En fonction du calcul, diluez l'éluat d'index dans un tube neuf. Mélangez brièvement au vortex et centrifugez pendant 3 s. Stockez l'éluat d'index restant à une température comprise en 2 °C et 8 °C jusqu'à 7 jour ou entre -15 °C et -30 °C jusqu'à 2 mois.

**Remarque :** *Assurez-vous qu'un volume total d'au moins 10 µl de BA\_DIL est disponible.*

**Remarque :** *La BA\_DIL est stable à une température comprise entre 2 °C et 8 °C jusqu'à 7 jours ou entre -15 °C et -30 °C jusqu'à 2 mois.*

### Analyse des données :

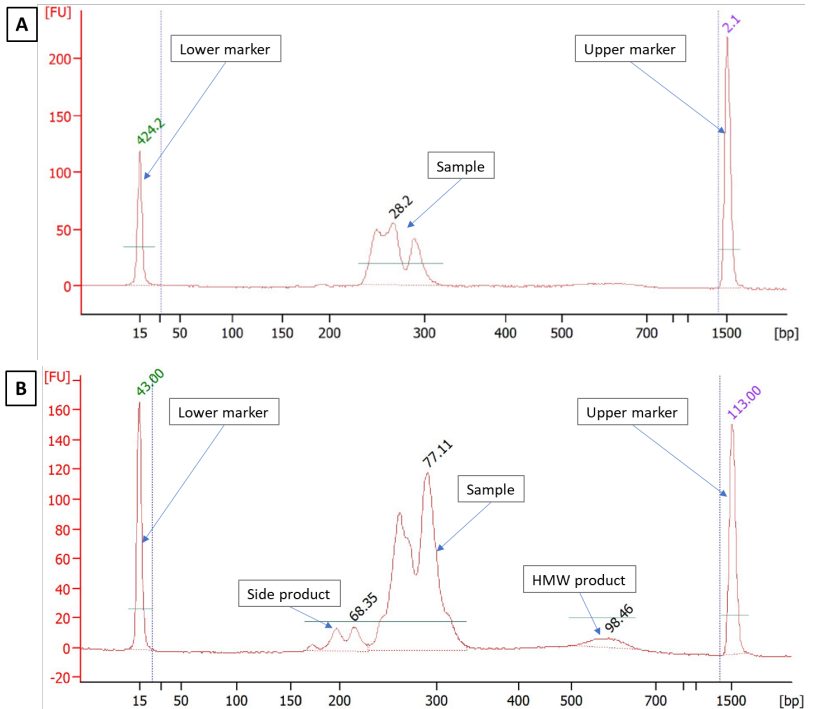
3. Vérifiez que le profil [Ladder Plot] (graphique en échelle) ressemble à la Figure 8 ci-dessous et comporte 13 pics avec le plus bas à 15 bp et le plus élevé à 1 500 bp (il s'agit des marqueurs qui se trouveront sur chaque échantillon Read) et une ligne de base plate (voir Figure 8).




**Figure 8 : Électrophorégramme en échelle (Bioanalyzer)**

4. Double-cliquez sur l'électrophorégramme appartenant au Puits 1 et sélectionnez l'onglet [Peak Table] (Tableau de pic) (voir Figure 9).
5. Sélectionnez [Manual Integration] (Intégration manuelle) en faisant un clic droit sur l'électrophorégramme.
6. Utilisez les lignes bleues pour délimiter tous les **pics visuels**, notamment le produit échantillon, le dimère d'amorce (produit secondaire) et le produit à poids moléculaire élevé (High Molecular Weight, HMW) **le long de la ligne zéro** (illustrés dans Figure 9B).

**Remarque :** Utilisez la touche *Ctrl* pour détacher les extrémités des lignes bleues de la ligne rouge. Si une ligne est sélectionnée, supprimez-la en faisant un clic droit puis en sélectionnant [Remove Peak] (Supprimer le pic). Insérez des lignes bleues supplémentaires sur n'importe quelle position en effectuant un clic droit sur [Add Peak] (Ajouter le pic).



**Figure 9 : Électrophorégrammes d'échantillon sur un Bioanalyzer. (A) Un électrophorégramme optimal sans aucun produit secondaire, (B) un exemple électrophorégramme avec des produits secondaires (par exemple, dimère d'amorce et gDNA (produit HMW)).**

7. En utilisant [Peak Description] (Description du pic) () , sélectionnez [Peak Molarity] (Molarité du pic) pour afficher la molarité respective pour chaque pic.
8. Enregistrez le fichier.
9. Répétez les étapes 4 à 8 pour les puits restants de chaque réplicat.
10. Calculez la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation (CV) de la somme de la molarité de tous les produits basés sur une mesure triple.

Critères d'acceptation et de rejet :

- Contrôle de la qualité de l'ADN : si la somme du produit, du dimère d'amorce et du produit HMW est < 2,0 nmol/l, la concentration d'ADN est trop faible pour le séquençage.
- Critère d'acceptation du rapport signal-bruit (S/B) : ≥ 90 %

$$S/B [\%] = \frac{\text{molarité des produits spécifiques}}{\text{somme des produits spécifiques, secondaires et HMW}} * 100$$

- Critère d'acceptation du contrôle de la précision : CV de la somme de la somme de la molarité de tous les produits ≤ 10 %

$$\text{Coefficient de variation} [\%] = \frac{\text{l'écart type}}{\text{moyenne}} * 100$$

**Remarque :** *Estimez l'écart type basé sur un échantillon.*

**Remarque :** *Si le rapport signal-bruit est défaillant en raison d'un pic non spécifique, cette valeur peut être exclue des calculs.*

**Remarque :** *Si le CV des triplicats est > 10 %, la valeur la plus basse peut être retirée des calculs de l'échantillon, tant que les deux autres valeurs sont conformes aux critères d'acceptation.*

**Remarque :** *Si un ou plusieurs critères sont défaillants, préparez une nouvelle BA\_DIL et répétez le cycle du Bioanalyzer.*

## 9.6 Séquençage sur Illumina NextSeq™ 500/550

Le séquençage des bibliothèques est réalisé à l'aide d'un dispositif Illumina NextSeq™ 500 ou 550 comme décrit dans le mode d'emploi fourni par Illumina.

Kits et réactifs nécessaires :

- **NextSeq™ 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cycles)**, Illumina, n° 20024904  
Entrée d'ADN total ≤ 377 ng (basée sur la mesure Qubit™ ► chapitre 4.3 *Quantification des échantillons (Qubit™)* du guide de préparation d'échantillon) OU
- **NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (150 cycles)**, Illumina, n° 20024907  
Entrée d'ADN total ≤ 1 304 ng (basée sur la mesure Qubit™ ► chapitre 4.3 *Quantification des échantillons (Qubit™)* du guide de préparation d'échantillon)
- **Hydroxyde de sodium (NaOH)**, 1 M
- **Solution de chlorhydrate Trizma®** pH 7,0, 1 M
- **Buffer EB** (tampon d'éluion), QIAGEN, n° 19086
- **RNase- and DNase-free distilled water**

Les étapes suivantes sont effectuées dans le laboratoire post-PCR.

Préparation des échantillons (concentration de la bibliothèque 2 nM de départ) pour le séquençage :

1. Calculez le volume total requis pour chaque bibliothèque 2 nM :

$$\text{Volume total } [\mu\text{l}] = \frac{3 \mu\text{l } BA\_DIL * \text{Concentration}_{\text{Bibliothèque}} \text{ in nM}}{2 \text{ nM}}$$

2. Calculer le volume requis de tampon Buffer EB :

$$\text{Volume}_{\text{Buffer EB}} [\mu\text{l}] = \text{Volume total} - 3 \mu\text{l } BA\_DIL$$

3. Préparer une dilution de librairie 2 nM pour chaque librairie conformément au calcul suivant :

$$\text{Dilution de librairie 2 nM} = 3 \mu\text{l BA\_DIL} + \text{Volume}_{\text{Buffer EB}}$$

**Remarque :** Ne pipetez pas de volume < 3  $\mu\text{l}$ .

**Remarque :** Si le volume de dilution 2 nM est < 10  $\mu\text{l}$ , ajustez le volume total.

4. *Facultatif* : Si deux plaques ont été traitées avec le Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit, regroupez les deux dilutions distinctes de librairie 2 nM dans une solution finale Library Pool Mix de 10  $\mu\text{l}$  conformément aux équations suivantes :

$$\text{Entrée d'ADN}_{\text{total}} = \sum \text{Entrée d'ADN}_{\text{plaqueA}} + \sum \text{Entrée d'ADN}_{\text{plaqueB}}$$

$$\text{Volume}_{\text{plaqueA}} = \frac{10 \mu\text{l}}{\text{Entrée d'ADN}_{\text{total}}} * \text{Entrée d'ADN}_{\text{plaqueA}}$$

$$\text{Volume}_{\text{plaqueB}} = \frac{10 \mu\text{l}}{\text{Entrée d'ADN}_{\text{total}}} * \text{Entrée d'ADN}_{\text{plaqueB}}$$

**Remarque :** Pipetez uniquement des volumes dans les plages acceptées des pipettes disponibles. Si des volumes inférieurs doivent être pipetés, augmentez le volume total de la solution finale Library Pool Mix.

5. Effectuez la dénaturation des librairies (mélangées) avec du NaOH 0,2 M fraîchement préparé (voir Tableau 20). Mélangez au vortex pendant 5 s et centrifugez pendant 3 s.

**Tableau 20 : Volumes nécessaires pour la dénaturation et la dilution de la librairie**

Librairie	NaOH 0,2 M	Tris-HCl 0,2 M	Tampon HT1
10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	970 $\mu\text{l}$

6. Incubez la librairie (mélangée) pendant 5 minutes entre 15 °C et 25 °C.



7. Ajoutez 10 µl de Tris-HCl 0,2 M, pH 7,0 à la librairie dénaturée (mélangée) (voir Tableau 20). Mélangez au vortex pendant 5 s et centrifugez pendant 3 s.
8. Diluez la librairie dénaturée (mélangée) à 20 pM en ajoutant 970 µl de tampon HT1 prérefrigéré (fourni avec le kit de séquençage Illumina, voir Tableau 20). Vortex for 5 s and spin down for 3 s.
9. Diluez la librairie dénaturée (mélangée) à 20 pM avec le tampon HT1 dans un nouveau tube jusqu'à la concentration de chargement finale et optimale en fonction du kit de séquençage et de l'appareil de séquençage sélectionnés (voir Tableau 21). Mélangez au vortex pendant 5 s et centrifugez pendant 3 s.

**Important** : *chaque dispositif de séquençage peut avoir une concentration de chargement finale optimale différente, qui doit être déterminée par l'utilisateur. Commencez par utiliser la concentration de chargement finale que nous recommandons, comme indiqué dans le Tableau 21. Augmentez la concentration de chargement si la densité d'agrégats est faible, diminuez la concentration de chargement si les cycles sont trop agrégés.*

**Tableau 21 : Volumes nécessaires pour la concentration de chargement finale recommandée pour le séquençage**

	Mid Output Kit	High Output Kit
<b>Concentration finale recommandée</b>	1,0 pM	1,1 pM
<b>Entrée de librairie</b>	65 µl	71 µl
<b>Tampon HT1</b>	1 235 µl	1 229 µl

10. Démarrez le cycle de séquençage à l'aide de NextSeq Control si un pipeline de démultiplexage distinct est mis en œuvre au site de séquençage (par exemple, bcl2fastq d'Illumina). Sinon, utilisez le logiciel Local Run Manager de l'appareil NextSeq pour démarrer le cycle de séquençage.
11. Démarrez le cycle de séquençage conformément au protocole de l'Illumina (Guide du système NextSeq™ 550, document n° 15069765v06) en utilisant les réglages suivants des paramètres du cycle dans le Tableau 22 :

**Tableau 22 : Paramètres de séquençage**

Type Read	Read unique		
	Read 1	Index 1	Index 2*
Longueur Read	148	10	10

\* La longueur Read avec index 2 est comprise uniquement lorsque deux plaques sont utilisées lors du même cycle de séquençage.

12. Lorsque vous utilisez le logiciel Local Run Manager, intégrez les paramètres d'adaptateur suivants dans le Tableau 23 (peuvent être copiés depuis la fiche d'échantillon) dans les « Advanced Module Settings » :

**Tableau 23 : Paramètres de l'adaptateur pour Local Run Manager**

Nom	Séquence
Adaptateur	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA

**Important :** La densité d'agrégats ne doit pas dépasser la valeur de 220 K/mm<sup>2</sup>. Si la densité d'agrégats est > 220 K/mm<sup>2</sup>, répétez le cycle de séquençage avec une concentration de chargement réduite. La densité recommandée est entre 150 et 220 K/mm<sup>2</sup>.

### Étapes suivantes

Reportez-vous au guide d'utilisation du logiciel Plasma-SeqSensei™ IVD (module d'analyse des données) pour poursuivre l'analyse des données de séquençage.

## 10 Assistance technique

Si un problème survient pendant le protocole du Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, veuillez contacter le service d'assistance local Sysmex pour obtenir de l'aide.



**Remarque :** *Le guide de préparation d'échantillon, le mode d'emploi du Plasma-SeqSensei™ IVD assay et du Plasma-SeqSensei™ IVD Software sont disponibles en ligne e plusieurs langues à l'adresse <https://sysmex-inostics.com/products/kit-specs/>.*

## 11 Caractéristiques de performance

### 11.1 Sensibilité analytique

L'évaluation de la limite de détection (Limit of Detection, LoD) a été réalisée conformément aux spécifications figurant dans les recommandations *CLSI EP17-A2*.

L'analyse comprenant des insertions, délétions, substitutions et délétions-insertions.

Le cut-off dérivé de LoD est de 6 molécules mutantes (MM).

Analyte (MM)	Taux de réussite en % (n=108)	LoD95
20	100	3,81 MM (CI95 3,25 MM – 4,65 MM)
10	100	
5	99,0	
2,5	87,0	
1,25	62,5	
0,625	41,7	

### 11.2 Spécificité analytique

La conception a été vérifiée in silico en utilisant l'analyse de type BLAST par rapport à une réactivité croisée et a été confirmée comme hautement spécifique. Les séquences hors cible comprenaient le génome humain ainsi que les séquences ADN publiquement disponibles des microorganismes/virus hématogènes typiques comme *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, cytomégalovirus, et le virus d'Epstein-Barr, du VIH et de l'hépatite C.

### 11.3 Précision/Répétabilité

L'évaluation de la précision a été réalisée conformément aux spécifications figurant dans les recommandations *CLSI EP05-A3*.

La précision qualitative est > 99 %.

La répétabilité quantitative est < 10 % (CV max.) et la précision intermédiaire est < 15 % à ≥ 20 MM.

MM cible	Répétabilité (CV max en %)	Précision intermédiaire
500	2,54	13,84
100	5,99	13,10
50	7,76	14,15
20	5,65	14,02

### 11.4 Plage de mesure/Linéarité

L'évaluation de la plage linéaire de l'entrée d'ADN a été réalisée conformément aux spécifications figurant dans les recommandations *CLSI EP06-A*.

Le protocole Plasma-SeqSensei™ présente la linéarité dans la plage d'entrée d'ADN du test (4,3 à 86 ng par échantillon).

### 11.5 Substances interférentes

La détermination des substances interférentes a été réalisée conformément aux spécifications figurant dans les recommandations *CLSI EP07-A2*.

Le protocole Plasma-SeqSensei™ a été confirmé comme robuste face aux substances interférentes communes. La présence d'hémoglobine ( $\leq 2$  g/l), de bilirubine ( $\leq 200$  mg/l), de triglycérides ( $\leq 15$  g/l), de mélanine ( $\leq 0,2$  µg/l) et d'éthanol ( $\leq 86,8$  mmol/l) n'a aucun impact sur la validité et les résultats du test.

### 11.6 Performance et caractéristiques cliniques

La performance clinique du Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD kit a été déterminée en testant 76 échantillons positifs et 78 échantillons négatifs pour tous les gènes cibles. La sensibilité est de 97 % (CI à 95 % : 90,9 % - 99,3 %) et la spécificité est de 95 % (CI à 95 % : 87,5 % - 98 %).

## 11 Caractéristiques de performance

---

		Méthode de référence : BC_P2 test		
		positif	négatif	total
Plasma- SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit	positive	74	4	78
	negative	2	74	76
	total	76	78	154

Le pourcentage global d'accord est de 96,1 %.

### 11.7 Limites

Les données de performance des échantillons situés à la limite de la plage de teneur en ADN autorisée peuvent s'écarter des valeurs indiquées et peuvent entraîner une baisse de la précision et de la répétabilité des échantillons faiblement concentrés ainsi que des valeurs de LoD inférieures pour les échantillons fortement concentrés.

## 12 Glossaire et terminologie

Terme	Définition
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BA_Dil	Dilution du Bioanalyzer
BLAST	Outil de recherche d'alignement local de base
bp	Paire de bases
CDx	Diagnostic compagnon
cfDNA	ADN libre circulant
CI	Intervalle de confiance
CLSI	Institut des normes cliniques et de laboratoire
COSMIC	Catalogue des mutations somatiques liées au cancer
ctDNA	ADN tumoral circulant
CV	Coefficient de variation
dbSNP	Base de données de polymorphisme d'un nucléotide simple
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
EB	Tampon d'éluion
EDTA	Acide éthylènediamine tetracétique
EtOH	Éthanol
FAM	Fraction d'allèle mutant
gDNA	ADN génomique
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HMW	Poids moléculaire élevé
IDU	Identifiant unique

## 12 Glossaire et terminologie

---

Terme	Définition
IDX	Index
IFU	Mode d'emploi
LoD	Limite de détection
MM	Molécules mutantes
Mpx	Mélange d'amorces pour PCR multiplexe
NaOH	Hydroxyde de sodium
NGS	Séquençage de nouvelle génération
NTC	Témoin négatif
PC	Témoin positif
PCR	Polymérisation en chaîne
QC	Contrôle qualité
TA	Température ambiante
VMN	Variation mononucléotidique



## 13 Références

- 1) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593.
- 2) Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin.* 2018 Jul;13(3):339-354. doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.006. PMID: 30100074; PMCID: PMC6092031.
- 3) Stewart CM, Kothari PD, Mouliere F, Mair R, Somnay S, Benayed R, Zehir A, Weigelt B, Dawson SJ, Arcila ME, Berger MF, Tsui DW. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):616-627. doi: 10.1002/path.5048. Epub 2018 Mar 12. PMID: 29380875; PMCID: PMC6656375.
- 4) Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 7;108(23):9530-5. doi: 10.1073/pnas.1105422108. Epub 2011 May 17. PMID: 21586637; PMCID: PMC3111315.
- 5) Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif.* 2019 Mar 18;17:100087. doi: 10.1016/j.bdq.2019.100087. PMID: 30923679; PMCID: PMC6425120.
- 6) Fiste O, Lontos M, Koutsoukos K, Terpos E, Dimopoulos MA, Zagouri F. Circulating tumor DNA-based predictive biomarkers in breast cancer clinical trials: a narrative review. *Ann Transl Med.* 2020 Dec;8(23):1603. doi: 10.21037/atm-20-1175. PMID: 33437802; PMCID: PMC7791253.
- 7) [Online] <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
- 8) Keup C, Benyaa K, Hauch S, Sprenger-Haussels M, Tewes M, Mach P, Bittner AK, Kimmig R, Hahn P, Kasimir-Bauer S. Targeted deep sequencing revealed variants in cell-free DNA of hormone receptor-positive metastatic breast cancer patients. *Cell Mol Life Sci.* 2020 Feb;77(3):497-509. doi: 10.1007/s00018-019-03189-z. Epub 2019 Jun 28. PMID: 31254045; PMCID: PMC7010653.
- 9) Fribbens C, Garcia Murillas I, Beaney M, Hrebien S, O'Leary B, Kilburn L, Howarth K, Epstein M, Green E, Rosenfeld N, Ring A, Johnston S, Turner N. Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2018 Jan 1;29(1):145-153. doi: 10.1093/annonc/mdx483. PMID: 29045530; PMCID: PMC6264798.

### 14 Copyrights et marques déposées

La reproduction non autorisée du contenu du présent manuel, en totalité ou en partie, est interdite sans autorisation préalable écrite de Sysmex Corporation, Japon.

Plasma-SeqSensei™ est une marque déposée de Sysmex Corporation, Japon.

Toutes les autres marques, tous les noms et produits sont, même lorsqu'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, sont des marques de commerce ou des marques déposées de leurs propriétaires respectifs.

## 15 Historique des révisions

Version du document	Date	Description des modifications	Section
R3	Décembre 2023	Mise à jour des notes sur le S/B et le CV lors de l'utilisation du Bioanalyzer	9.5
R2	Novembre 2023	Mise à jour des limites de détection des mutations germinales	6
		Informations sur le rapport d'une couverture incomplète des triplets de nucléotides codant pour les acides aminés	6
		Réduction de la limite supérieure de température du laboratoire et spécification de la température ambiante (15 °C à 25 °C)	8.2 9
		Mise à jour du lien de téléchargement des modes d'emploi, FDS	8.3 10
		Nombre minimum d'échantillons par High Output kit inclus	9
		Mise à jour des recommandations de dilution et de quantification des échantillons avec Qubit™	9.1
		Informations sur la manipulation des billes magnétiques AMPure	9.2 9.2 étape 15 9.4 étape 7
		Intégration des informations détaillées sur la dénaturation, la dilution et l'initiation du séquençage des échantillons	9.6 étapes 5-12
		Ajout d'informations sur la caractérisation des performances	11.1 11.6 11.7
		Ajout du tableau « Historique des révisions »	15
		Corrections mineures, modifications d'orthographe, de mise en page et d'ordre	
R1	Juin 2022	N.D.	



Décembre 2023  
ZR150547.R3

Sysmex Inostics GmbH  
Falkenried 88  
20251 Hamburg, Allemagne  
[www.sysmex-inostics.com](http://www.sysmex-inostics.com)

© 2023 Sysmex Inostics  
Tous droits réservés.

