

Agendia NV.

MammaPrint® and BluePrint® Breast Cancer Recurrence and Molecular Subtyping Kit & ADAPT Software – Consignes d'utilisation

*Séquençage ciblé d'ARN à partir de sections de tissu fixé au formaldéhyde
et inclus en paraffine pour évaluer le risque de récurrence du cancer du sein
et déterminer le sous-typage moléculaire*



AGENDIA®
MAMMAPRINT+BLUEPRINT

Identifiant du document : **MKT-339 v7**

Pour afficher le présent document dans d'autres langues, veuillez consulter la page : <https://diagnostic-products.agendia.com/resources/>

Table des matières

Usage prévu	3
Résumé et présentation du test	4
Ce qui est mesuré et détecté	4
Principe de la procédure	4
Réactifs.....	5
Réactifs fournis	5
Réactifs et équipements requis, non fournis	7
Avertissements et précautions	8
Stockage et manipulation	9
Collecte des spécimens et préparation pour analyse	10
Contrôle qualité	10
Évaluation de la qualité d'analyse	10
Contrôle qualité 1 : évaluation de la qualité de l'ARN total FFIP purifié	10
Contrôle qualité 2 : évaluation de la qualité des banques d'ADNc ligaturé par adaptateur et amplifié	11
Contrôle qualité 3 : évaluation de la qualité des banques indexées, aux cibles enrichies et amplifiées	11
Contrôles du test.....	11
Procédure de test.....	11
Étape 1 : préparation et évaluation de la qualité de l'ARN FFIP.....	13
Étape 2 : préparation de la banque NGS Agendia	13
Étape 3 : enrichissement de cibles NGS Agendia.....	21
Contrôle qualité 3 : évaluation de la qualité des banques indexées, aux cibles enrichies et amplifiées.....	27
Étape 4 : chargement du séquenceur MiSeq MGS Agendia	29
Étape 5 : analyse des fichiers FASTQ via le logiciel ADAPT	32
Résultats.....	33
Interprétation des résultats	33
MammaPrint	33
Blueprint	34
Limitations de la procédure	34

Valeurs attendues	35
MammaPrint	35
Blueprint	35
Caractéristiques de performances	36
MammaPrint	36
Blueprint	37
Assistance.....	40
Date de publication :	40
Avis de sécurité	41
Bibliographie	43
Annexe A : séquences nucléotidiques des indices 8 bp NGS MammaPrint Blueprint.....	45

Kit de diagnostic in vitro du risque de récurrence du cancer du sein et de sous-typage moléculaire
MammaPrint® BluePrint®

Utilisateurs prévus

Usage réservé aux laboratoires professionnels

Avant d'effectuer régulièrement le test, les laboratoires doivent suivre le programme d'intégration et de formation d'Agendia. Une fois le programme correctement suivi, un certificat sera émis.

LISEZ ATTENTIVEMENT TOUTES LES CONSIGNES AVANT UTILISATION.

Usage prévu

Le kit de diagnostic in vitro du risque de récurrence du cancer du sein et de sous-typage moléculaire MammaPrint BluePrint est un test qualitatif non automatisé de diagnostic in vitro, dont l'usage est réservé aux laboratoires cliniques, qui utilise une technologie d'enrichissement de cibles pour le séquençage de nouvelle génération (NGS) afin d'analyser l'expression génique sur des échantillons de tissu cancéreux du sein fixé au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFIP) pour évaluer le risque de métastase à distance et déterminer le sous-type moléculaire. Ce dispositif est réservé à un usage professionnel en laboratoire.

MammaPrint et BluePrint fournissent des informations concernant la prédiction de la magnitude des avantages du traitement systémique afin de guider les décisions thérapeutiques chez les patientes atteintes d'un cancer du sein.

Les gènes analysés par MammaPrint et BluePrint mesurent les caractéristiques des différentes étapes de survie, de prolifération, de dissémination et de métastase des cellules du cancer du sein, comme indiqué dans l'article The hallmarks of cancer (Haan et al., 2021) [1].

Le test MammaPrint sur 70 gènes a pour but de différencier les patientes qui présentent un risque élevé de développer des métastases à distance dans les cinq ans qui suivent le diagnostic de celles dont le risque de métastases est bas [2] [3] [4]. Le test BluePrint sur 80 gènes a pour but d'évaluer le sous-type moléculaire du cancer du sein et de déterminer si les tumeurs sont de type luminal, HER2 ou basal [5].

Le kit NGS MammaPrint et BluePrint est réalisé sur des patientes atteintes d'un cancer du sein de niveau I ou II, avec des ganglions lymphatiques négatifs ou avec trois ganglions lymphatiques positifs maximum, dont la taille de la tumeur est inférieure ou égale à 5 cm, et sur des patientes atteintes d'un cancer du sein de niveau III. Le résultat du test MammaPrint peut uniquement être utilisé par les médecins en tant que marqueur pronostique, parallèlement à d'autres facteurs clinicopathologiques [6]. Le kit NGS MammaPrint BluePrint est exécuté sur le système séquenceur Illumina® MiSeq® et les résultats sont analysés à l'aide du logiciel ADAPT (Agendia Data Analysis Pipeline Tool).

Résumé et présentation du test

Ce qui est mesuré et détecté

Le kit NGS MammaPrint Blueprint indique le risque (faible ou élevé) de récurrence de la maladie et détermine le sous-type moléculaire d'une tumeur de manière individualisée.

MammaPrint détermine l'activité de 70 gènes dans un échantillon de tumeur, ce qui permet d'obtenir un profil d'expression (ou empreinte) de la tumeur. Le profil d'expression génique est utilisé pour calculer, à l'aide d'un algorithme exclusif, l'indice MammaPrint (IMP), qui indique le profil pronostique de risque de récurrence du cancer du sein.

Blueprint détermine l'activité de 80 gènes dans un échantillon de tumeur, ce qui permet d'obtenir trois profils d'expression. Les profils d'expression génique sont utilisés pour calculer, à l'aide d'un algorithme exclusif, les indices Blueprint, qui permettent de déterminer le sous-type moléculaire de l'échantillon : luminal, HER2 ou basal. Les gènes et algorithmes de notation utilisés pour le kit NGS MammaPrint Blueprint sont identiques à ceux utilisés pour les tests MammaPrint et Blueprint effectués dans le Diagnostic Service Laboratory d'Agendia, sur un microréseau ([2] [3] [4] [7] [8] [9]).

Principe de la procédure

Le kit NGS MammaPrint Blueprint est un procédé de laboratoire non automatisé qui utilise le séquençage de captures pour déterminer l'expression génique dans l'ARN isolé à partir de tissu FFIP avec une teneur en cellules tumorales d'au moins 30 %.

Le kit NGS permet de préparer des banques NGS ciblées à partir de l'ARN FFIP en utilisant le système d'enrichissement de cibles ARN Agilent SureSelect^{XT} en l'absence d'étape de déplétion ribosomique. Le flux de travail basé sur l'enrichissement de cibles utilise des appâts d'ARNc biotinylé ultra-long (120 bases) pour capturer les gènes MammaPrint et Blueprint et les enrichir à partir d'une banque de fragments génomiques NGS. Les données relatives au nombre de lectures, générées à partir du résultat du séquençage (au format FASTQ), sont utilisées pour évaluer les niveaux d'expression des profils MammaPrint et Blueprint et pour exprimer les résultats du test.

Le résultat du séquençage est transféré de manière sécurisée via le portail Web d'Agendia et l'analyse est effectuée à l'aide du logiciel ADAPT (Agendia Data Analysis Pipeline Tool). Le résultat du test MammaPrint inclut l'indice IMP sur une échelle de -1 000 à +1 000 et détermine le profil pronostique de l'échantillon : faible risque (IMP supérieur à +0) ou haut risque (IMP égal ou inférieur à 0). Le résultat du test Blueprint inclut trois indices Blueprint, l'indice le plus élevé détermine le sous-type moléculaire de l'échantillon.

Réactifs

Réactifs fournis

Le catalogue 931280 a été configuré pour un maximum de 16 réactions.

Préparation de la banque d'ARN NGS MammaPrint Blueprint (pré-PCR) Numéro de catalogue 931281 [boîte 1 sur 4]			-15 °C à -25 °C
Composant	Numéro	Volume	
Agendia NGS Fragmentation Mix	931281-01	304 µL	
Agendia NGS First Strand Master Mix	931281-02	140 µL	
Agendia NGS Second Strand + End Repair Enzyme Mix	931281-03	400 µL	
Agendia NGS Second Strand + End Repair Oligo Mix	931281-04	80 µL	
Agendia NGS dA Tailing Master Mix	931281-05	320 µL	
Agendia NGS Oligo Adaptor Mix	931281-06	80 µL	
Agendia NGS Ligation Master Mix	931281-07	80 µL	
Agendia NGS Forward PCR Primer	931281-08	60 µL	
Agendia NGS PCR Master Mix	931281-09	800 µL	
Agendia NGS Uracil DNA Glycosylase	931281-10	16 µL	
Agendia NGS Reverse PCR Primer	931281-11	16 µL	
Agendia NGS Nuclease-Free Water	931282-07	2,4 ml	

Enrichissement de cibles NGS MammaPrint Blueprint (post-PCR, boîte 2) Numéro de catalogue 931283 [boîte 3 sur 4]			-15 °C à -25 °C
Composant	Numéro	Volume	
Agendia NGS Indexing Block 1	931283-01	45 µL	
Agendia NGS Block 2	931283-02	45 µL	
Agendia NGS Indexing Block 3	931283-03	12 µL	
Agendia NGS RNase Block	931283-04	18 µL	
Agendia NGS Hyb 3	931283-05	160 µL	
Agendia NGS Post-Cap PCR Primer	931283-06	16 µL	
Agendia NGS PCR Master Mix	931281-09	800 µL	
Agendia NGS 8bp Index Plate*	931283-07	12 µL	

Enrichissement de cibles NGS MammaPrint Blueprint (post-PCR, boîte 1) Numéro de catalogue 931282 [boîte 2 sur 4]			15 °C à 30 °C
Composant	Numéro	Volume	
Agendia NGS Hyb 1	931282-01	400 µL	
Agendia NGS Hyb 2	931282-02	1,25 ml	
Agendia NGS Hyb 4	931282-03	1,25 ml	
Agendia NGS Binding Buffer	931282-04	13,2 ml	
Agendia NGS Wash Buffer 1	931282-05	8 ml	
Agendia NGS Wash Buffer 2	931282-06	24 ml	
Agendia NGS Nuclease-Free Water	931282-07	2,4 ml	
Agendia NGS Elution Buffer	931282-08	5,8 ml	
Agendia NGS Neutralization Buffer	931282-09	960 µL	
MammaPrint Blueprint Package Insert	931282-10	1x	

Panel NGS MammaPrint Blueprint Numéro de catalogue 931284 [boîte 4 sur 4]			75 °C à -85 °C
Composant	Numéro	Volume	
MammaPrint Blueprint NGS Baits Library	931284	36 µL	

* Des séquences d'indices sont disponibles en [Annexe A : séquences nucléotidiques des indices NGS MammaPrint Blueprint](#).

Réactifs et équipements requis, non fournis

Réactif	Fabricant, numéro de catalogue
RNA Isolation RNeasy FFPE Kit	QIAGEN, 73504
Actinomycine D	Obtenue à partir de bactéries du genre Streptomyces (Sigma-Aldrich,
Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1	Invitrogen, 65601 ou 65602
Agencourt AMPure XP	Beckman Coulter Genomics, A63880, A63881 ou A63882
MiSeq Reagent Kit v3 Kit (150 cycles)	Illumina, MS-102-3001
PhiX Control Kit V3	Illumina, FC-110-3001
Diméthyl sulfoxyde	Qualité biologie moléculaire (Sigma-Aldrich, D8418)
Buffer EB	QIAGEN, 19086
Éthanol (EtOH), 100 %	Qualité biologie moléculaire (VWR, 1085430250)
Tween 20	Non ionique (Sigma-Aldrich, P7949)
Eau sans nucléase	Eau déminéralisée sans nucléase, sans additifs chimiques (QIAGEN,
Hydroxyde de sodium (NaOH)	1N, qualité biologie moléculaire (Sigma-Aldrich, 72068)
Xylène	N'importe lequel disponible
Histo-Clear	National Diagnostics, HS-200

Équipement	Spécifications minimales
Plate-forme d'analyse des acides nucléiques et consommables	ARN DV200 200 nt - 4 000 nt ADN 150 bp - 550 bp (sensibilité quantitative 0,5 à 50 ng/μl) ADN 150 bp - 700 bp (sensibilité quantitative 5 à 500 pg/μl)
Agitateur vortex	N'importe lequel disponible
Centrifugeuse	Pour tubes de 1,5 ml/0,5 ml
Centrifugeuse pour plaques	Pour plaques MIDI de 0,8 ml
Centrifugeuse sous vide	Plage de températures : de 15 °C à 45 °C
Blocs chauffants	37 °C pour plaques MIDI de 0,8 ml
Agitateur thermique	27 °C et 65 °C
Minuterie	Traçabilité NIST
Support magnétique	Pour plaques de 0,80 ml (Life Technologies, AM10027) Pour tubes par bande de 8 de 0,2 ml (Life Technologies, 12331D) Pour tubes de 1,5 ml/2 ml (Life Technologies, 12321D)
Thermocycleur	Couvercle thermique : 105 °C
Pipettes monocanal	De 1 μl à 1 000 μl
Tubes par bande de 8/centrifugeuse	N'importe lequel disponible
Pipettes multicanaux (<i>en option</i>)	De 1 μl à 1 000 μl
Pipettes à répétition (<i>en option</i>)	De 1 μl à 10 ml
Système MiSeq	Illumina, SY-410-1003 ou Illumina, DX-410-1001 mode RUO

*Remarque : L'utilisation des réactifs et équipements généraux répertoriés ci-dessus en association avec le kit NGS MammaPrint Blueprint a été validée par Agendia. Ces validations ont démontré que l'association de ces réactifs et équipements généraux et du kit NGS est sûre et performante (reportez-vous à la section Caractéristiques de performances).

Avertissements et précautions

- Pour l'utilisation dans le cadre de diagnostics *in vitro*.
- Ce dispositif est réservé à l'usage de laboratoires professionnels, formés et certifiés par Agendia.
- Les résultats fournis par le kit de diagnostic *in vitro* du risque de récurrence du cancer du sein et de sous-typage moléculaire MammaPrint BluePrint peuvent uniquement être utilisés par les Médecins qu'en association avec des facteurs clinicopathologiques standard. Le test n'est pas conçu pour déterminer l'issue de la maladie. Le dispositif doit être utilisé avec des échantillons de tissu cancéreux du sein fixé au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFIP).
- N'utilisez pas le contenu du kit au-delà de la date d'expiration imprimée sur la partie extérieure de la boîte.
- N'intervertissez pas les composants de test de différents lots de kits. Notez que les lots de kits sont identifiés sur l'étiquette extérieure de la boîte.
- Stockez les composants du kit aux températures spécifiées dans les zones de pré-amplification et de post-amplification indiquées.
- Pour obtenir des résultats corrects, vous devez suivre à la lettre les consignes de la procédure de test. Le non-respect des consignes, les modifications apportées aux consignes du système de test ou l'utilisation de réactifs, d'instruments ou d'outils d'analyse et de création de rapports non recommandés par Agendia peuvent invalider les résultats du test. Le non-respect des consignes de déparaffinage, d'isolement d'ARN, d'enrichissement de cibles et de séquençage peut invalider les résultats du test.
- Le pourcentage de cellules tumorales invasives doit être d'au moins 30 % comme requis pour obtenir des résultats valables.
- Des processus d'identification de tissus/d'échantillons adaptés aux laboratoires sont mis en place pour garantir l'intégrité des échantillons.
- Un ARN inadapte ou de mauvaise qualité peut entraîner des résultats incorrects.
- Demandez une formation spécifique ou des conseils si vous n'avez pas d'expérience dans le domaine des procédures d'isolement d'ARN ou de séquençage de nouvelle génération.
- Pour obtenir des informations au sujet de l'environnement, de la santé et de la sécurité, reportez-vous aux fiches de données de sécurité (FDS) disponibles sous <https://diagnostic-products.agendia.com/resources/>.
- .
- Utilisez les consignes de laboratoire habituelles. Ne pipetez pas à la bouche. Ne mangez, ne buvez et ne fumez pas dans les zones de travail indiquées du laboratoire. Portez des gants jetables et une blouse lors de la manipulation de spécimens et de réactifs de test. Lavez-vous bien les mains après manipulation de spécimens et de réactifs de test.
- L'actinomycine D est obtenue sous forme de solide, préparée à une concentration de 4 µg/µl dans du diméthylsulfoxyde et stockée dans des aliquots à usage unique de 3 µl à -20 °C et à l'abri de la lumière. Les aliquots peuvent être stockés pendant un an maximum avant utilisation. La concentration de 4 µg/µl d'actinomycine D dans du diméthylsulfoxyde est diluée avec de l'eau, immédiatement avant utilisation, de manière à obtenir une concentration finale de 120 ng/µl d'actinomycine D.
- REMARQUE : l'actinomycine D utilisée à l'étape 2 de la procédure est dangereuse. Toxicité aiguë :

orale, dermale et inhalation.



- Portez des équipements de protection individuelle (EPI) adaptés lorsque vous travaillez dans le laboratoire.



Stockage et manipulation

Le contenu du kit est stable jusqu'à la date d'expiration imprimée sur l'étiquette extérieure de la boîte.

Les boîtes doivent être conservées aux températures suivantes :

- Boîtes 1 et 3 : entre -15 °C et -25 °C
- Boîte 2 : entre 15 °C et 30 °C. À conserver à l'abri de la lumière directe du soleil.
- Boîte 4 : entre -75 °C et -85 °C

Le dispositif peut être utilisé pour un maximum de 16 réactions. Les réactifs sont stables pendant cinq cycles de congélation/décongélation maximum avant la date d'expiration indiquée sur la boîte.

Le test doit être effectué en laboratoire, à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C).

Avant utilisation, mélangez bien au vortex et assurez-vous visuellement de l'absence de précipités.

Veillez à préparer du NaOH 0,2 N frais chaque jour. Il reste stable pendant 12 heures maximum lorsqu'il est stocké à température ambiante.

Préparez de l'éthanol à 70 % frais chaque jour.

Respectez les pratiques d'excellence suivantes lors de la manipulation de billes PCR Clean-Up AMPure XP Beads et Library Streptavidin Beads :

- Les billes PCR Clean-Up AMPure XP Beads ne doivent jamais être congelées.
- Laissez les billes AMPure XP Beads à température ambiante pendant au moins 30 minutes avant utilisation.
- Juste avant utilisation, mélangez les billes au vortex jusqu'à ce qu'elles soient bien en suspension et qu'une couleur homogène apparaisse.
- Mélangez bien l'échantillon une fois les billes Streptavidin ajoutées en remplissant et en vidant une pipette dix fois.
- Incubez le mélange billes/échantillon à température ambiante pendant toute la durée indiquée.

La contamination PCR peut entraîner des résultats incorrects et non fiables. Pour éviter la contamination, veillez à ce que les zones de pré-amplification et de post-amplification disposent d'équipements dédiés (pipettes, embouts de pipettes, agitateur vortex et centrifugeuse).

Évitez la contamination croisée. Utilisez des embouts de pipettes frais entre chaque échantillon et chaque réactif. Mélangez les échantillons à l'aide d'une pipette et centrifugez la plaque lorsque cela est indiqué. Sauf mention contraire, ne mélangez pas les plaques au vortex. Utilisez des embouts qui résistent aux aérosols afin de réduire le risque de transfert de produit d'amplification et de contamination croisée entre les échantillons.

Traitement des déchets

Traitez les réactifs utilisés comme des déchets chimiques et mettez-les au rebut conformément aux législations et réglementations régionales, nationales et locales applicables. Pour obtenir des informations au sujet de l'environnement, de la santé et de la sécurité, reportez-vous aux fiches de données de sécurité (FDS) disponibles sous <https://diagnostic-products.agendia.com/resources/>.

Le dispositif n'inclut pas de tissus, de cellules ou de substances d'origine animale, humaine ou microbienne.

Collecte des spécimens et préparation pour analyse

La manipulation des tissus avant fixation doit être gérée conformément au protocole du laboratoire professionnel.

Sélectionnez le bloc tumoral de tissu cancéreux du sein FFIP pour chaque spécimen à traiter en utilisant un échantillon de tissu contenant la plus grande quantité de carcinome invasif et cohérent sur le plan morphologique avec le diagnostic émis. Le bloc tumoral FFIP sélectionné ne doit pas dater de plus de cinq ans. Veillez à ce que l'échantillon soit identifié de manière unique tout au long du processus.

Le stockage de l'échantillon FFIP doit être effectué conformément au protocole du laboratoire professionnel.

Pour chaque bloc de tissu, dix lames de 5 µm doivent ensuite être sectionnées avec une section sérielle de 5 µm sur chaque lame. Nous vous recommandons d'utiliser des lames chargées afin de réduire le risque que les sections tombent de la lame. Une lame sera utilisée pour la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (coloration HE) afin de déterminer le pourcentage de cellules tumorales, les autres lames peuvent être utilisées, totalement ou en partie, pour l'isolement d'ARN selon la taille du tissu. Le déparaffinage doit être effectué avec du xylène ou de l'Histo-Clear¹.

Le pourcentage de cellules tumorales invasives doit être d'au moins 30 % comme requis pour obtenir des résultats valables. Lorsque cela est nécessaire et possible, une microdissection peut être effectuée pour éviter de grandes zones de carcinome, de nécrose, de tissu adipeux, de stroma et/ou d'hémorragie *in-situ*, ces zones réduiront en effet le pourcentage total de cellules tumorales invasives.

Contrôle qualité

Procédez à l'étalonnage et à l'entretien des équipements utilisés dans le cadre des processus de laboratoire conformément aux exigences de contrôle qualité standard de votre laboratoire.

Évaluation de la qualité d'analyse

Contrôle qualité 1 : évaluation de la qualité de l'ARN total FFIP purifié

Ce contrôle qualité évalue la qualité de l'ARN total FFIP en fonction de la mesure VD200.

¹ L'Histo-Clear a fait l'objet de tests pour l'utilisation avec le kit NGS MammaPrint Blueprint.

La VD200 est mesurée en tant que pourcentage de fragments d'ARN dont la longueur est comprise entre 200 nt et 4 000 nt.

Contrôle qualité 2 : évaluation de la qualité des banques d'ADNc ligaturé par adaptateur et amplifié

Ce contrôle qualité évalue la qualité (la taille des fragments d'ADNc doit être comprise entre 150 et 550 bp) et la quantité (ng/μl) de la banque d'ADNc ligaturé par adaptateur.

Contrôle qualité 3 : évaluation de la qualité des banques indexées, aux cibles enrichies et amplifiées

Ce contrôle qualité évalue la qualité (la taille des fragments d'ADNc doit être comprise entre 150 et 700 bp), la quantité (pg/μl) et la molarité (pmol/l) de la banque indexée, aux cibles enrichies et amplifiée.

Contrôles du test

Les pratiques d'excellence en laboratoire suggèrent d'évaluer le matériel de contrôle pour détecter les différences de procédures techniques au sein du laboratoire de l'utilisateur qui peuvent entraîner une variabilité importante ou des erreurs dans les résultats.

Il est recommandé de vérifier les performances du test avant la première utilisation du test dans le laboratoire de l'utilisateur en testant plusieurs échantillons dont les résultats sont connus.

Procédure de test

Illustration 1 fournit une vue d'ensemble de la procédure.

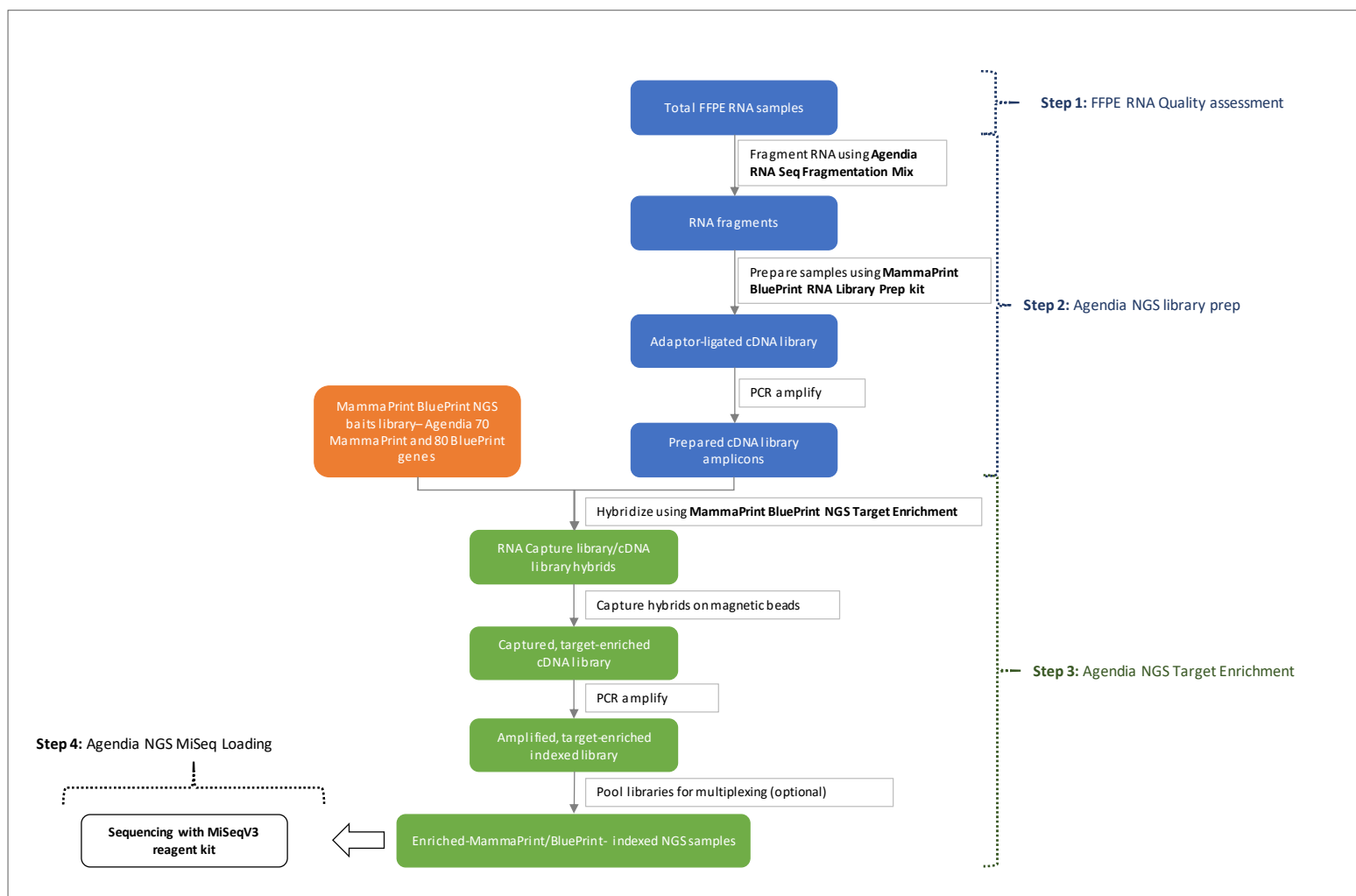


Illustration 1 : vue d'ensemble de la procédure du kit NGS MammaPrint Blueprint

Étape 1 : préparation et évaluation de la qualité de l'ARN FFIP

L'isolement d'ARN est effectué à l'aide du kit QIAGEN RNeasy FFPE Kit, conformément aux consignes d'utilisation du fabricant. L'ARN total FFIP isolé doit avoir des valeurs de rapport d'absorption 260/280 et 260/230 proches de 2 pour les deux rapports. Les rapports présentant un écart significatif par rapport à 2 peuvent indiquer la présence de contaminants organiques ou inorganiques, qui peuvent nécessiter une purification supplémentaire ou qui peuvent signifier que l'échantillon n'est pas adapté à l'utilisation avec le kit NGS MammaPrint Blueprint.

Avant de commencer, préparez l'ARN total de chaque échantillon dans de l'eau sans nucléase.

Évaluation de la qualité de l'ARN FFIP			
1.1	Déterminez la valeur VD200 des échantillons d'ARN FFIP à l'aide d'une plate-forme d'analyse de fragments d'acide nucléique adaptée.		
	Prélevez 200 ng d'ARN par échantillon pour les échantillons de qualité standard, de qualité bonne à moyenne et de mauvaise qualité.		
	S'il n'y a pas 200 ng, prélevez la quantité d'ARN indiquée dans le tableau ci-dessous.		
	Catégorie	Valeur de distribution (VD200)	Quantité d'ARN requise pour la préparation de la banque
	Standard	≥70 % au-dessus de 200 nt	100 ng
	Bonne à moyenne	≥50 % au-dessus de 200 nt	150 ng
	Mauvaise	≥20 % au-dessus de 200 nt	200 ng
	Non recommandée	<20 % au-dessus de 200 nt	Non recommandée

Étape 2 : préparation de la banque NGS Agendia

Fragmentation de l'ARN et hybridation des amorces	
2.1	Décongelez le composant Agendia NGS Fragmentation Mix à température ambiante et placez-le sur de la glace.
2.2	Décongelez le composant Agendia NGS First Strand Master Mix sur de la glace.
2.3	Utilisez une centrifugeuse sous vide (≤45 °C) pour lyophiliser les aliquots d'ARN FFIP. <u>Ne faites pas trop sécher.</u>
2.4	Mélangez le composant Agendia NGS Fragmentation Mix au vortex pendant dix secondes. Remettez l'ARN FFIP en suspension dans 19 µl de composant Agendia NGS Fragmentation Mix . Mélangez au vortex et passez rapidement à la centrifugeuse.
2.5	Exécutez le programme suivant du thermocycleur pour les échantillons à ARN de qualité standard et de bonne qualité/qualité moyenne : Couvercle thermique à 95 °C 1. Deux minutes à 94 °C 2. Trois minutes à 65 °C 3. Au moins une minute à 4 °C Conservez à 4 °C ou sur de la glace jusqu'à utilisation.
2.6	Exécutez le programme suivant du thermocycleur pour les échantillons à ARN de mauvaise qualité : Couvercle thermique à 95 °C 1. Cinq minutes à 65 °C 2. Au moins une minute à 4 °C Conservez à 4 °C ou sur de la glace jusqu'à utilisation.

Synthèse du premier brin d'ADNc		
2.7	Préparez 120 ng/μl d' actinomycine D fraîche diluée conformément au tableau ci-dessous. Ce volume suffit à 96 réactions.	
	Agendia NGS Nuclease-Free Water	97 μL
	Actinomycine D (4 μg/μl dans du diméthylsulfoxyde)	3 μL
	<i>Volume total</i>	100 μL
	Mélangez au vortex, passez rapidement à la centrifugeuse, conservez à température ambiante et protégez de la lumière.	
2.8	Préparez le composant Agendia NGS First Strand Synthesis Mix conformément au tableau ci-dessous. Procédez au calcul pour une réaction supplémentaire.	
	Remarque : mélangez le composant First Strand Master Mix au vortex pendant 10 secondes avant d'associer les réactifs.	
	Réactif	Volume par réaction
	Actinomycine D (120 ng/μl dans de l'eau)	0,5 μl
	Agendia NGS First Strand Master Mix	8 μl
	<i>Volume total</i>	8,5 μl
Mélangez au vortex, passez rapidement à la centrifugeuse et conservez sur de la glace.		
2.9	Sur de la glace, ajoutez 8,5 μl de composant Agendia NGS First Strand Synthesis Mix à chaque puits d'une nouvelle plaque de premier brin d'ADNc.	
2.10	Transférez l'ARN FFIP dans les puits de la plaque du premier brin d'ADNc. Fermez la plaque, mélangez au vortex et passez rapidement à la centrifugeuse.	
2.11	Exécutez le programme suivant du thermocycleur :	
	Couvercle thermique à 95 °C 1. 10 minutes à 25 °C 2. 40 minutes à 37 °C 3. Au moins trois minutes à 4 °C Conservez à 4 °C ou sur de la glace jusqu'à utilisation.	

Synthèse du deuxième brin d'ADNc et réparation des extrémités		
2.12	Préparez le composant Second Strand Synthesis and End Repair Mix conformément au tableau ci-dessous. Procédez au calcul pour une réaction supplémentaire.	
	Remarque : mélangez chaque réactif au vortex pendant 5 secondes avant l'association.	
	Réactif	Volume par réaction
	Agendia NGS Second Strand + End Repair Enzyme Mix	25 µl
	Agendia NGS Second Strand + End Repair Oligo Mix	5 µl
	Volume total	30 µl
	Mélangez au vortex, passez rapidement à la centrifugeuse et conservez sur de la glace.	
2.13	Ajoutez 30 µl de composant Second Strand Synthesis and End Repair Mix à chaque puits.	
2.14	Fermez la plaque, mélangez au vortex et passez rapidement à la centrifugeuse.	
2.15	Exécutez le programme suivant du thermocycleur : N'utilisez pas le couvercle thermique. Si le couvercle thermique ne peut être désactivé, le programme doit être exécuté avec le couvercle ouvert. 1. 60 minutes à 16 °C 2. Au moins trois minutes à 4 °C Conservez à 4 °C ou sur de la glace jusqu'à utilisation.	

Purification de l'ADNc synthétisé à l'aide de billes AMPure XP Beads	
2.16	Laissez les billes AMPure XP Beads à température ambiante pendant au moins 30 minutes. Mélangez la suspension de billes au vortex jusqu'à ce qu'elle soit homogène. Si vous passez à l' adénylation de l'extrémité 3' de l'ADNc , décongelez le composant Agendia NGS dA Tailing Master Mix sur de la glace.
2.17	Ajoutez 108 µl de suspension de billes homogène à chaque puits d'une nouvelle plaque MIDI à 96 puits de 0,8 ml.
2.18	Transférez 57,5 µl du mélange de l'échantillon dans le puits correspondant de la plaque MIDI à 96 puits de 0,8 ml.
2.19	Fermez la plaque, mélangez au vortex et passez rapidement à la centrifugeuse.
2.20	Incubez les échantillons pendant cinq minutes à température ambiante.
2.21	Placez la plaque sur le support magnétique à température ambiante pendant au moins cinq minutes.
2.22	Tandis que la plaque se trouve sur le support magnétique, retirez et jetez délicatement la solution claire de chaque puits. Ne touchez pas les billes lors du retrait de la solution.
2.23	Tandis que la plaque se trouve sur le support magnétique, versez 200 µl d'éthanol à 70 % frais dans chaque puits.
2.24	Attendez 10 secondes (ou jusqu'à ce que la solution soit claire), le temps que les billes déplacées retombent, et retirez délicatement l'éthanol.
2.25	Répétez pour un total de deux lavages.
2.26	Si nécessaire, passez rapidement la plaque MIDI à la centrifugeuse, remettez la plaque sur le support magnétique et retirez les gouttelettes d'éthanol restantes à l'aide d'une pipette.
2.27	Faites sécher les échantillons sur le bloc thermique à 37 °C pendant trois minutes. Ne les faites pas trop sécher. Veillez cependant à ce qu'il n'y ait plus d'éthanol.
2.28	Ajoutez 21,5 µl d'eau sans nucléase à chaque puits d'échantillon.
2.29	Fermez la plaque, mélangez bien au vortex et passez rapidement la plaque à la centrifugeuse pour recueillir le liquide.
2.30	Incubez pendant deux minutes à température ambiante.
2.31	Placez la plaque MIDI sur le support magnétique et incubez pendant cinq minutes ou jusqu'à ce que la solution soit claire.
2.32	Retirez 20 µl de surnageant et ajoutez-le à une nouvelle plaque à 96 puits de 0,2 ml.
Point d'arrêt : si vous ne passez pas à l'étape suivante, fermez la plaque et stockez-la à une température comprise entre -15 °C et -25 °C.	

Adénylation de l'extrémité 3' de l'ADNc					
2.33	Décongelez le composant Agendia NGS dA Tailing Master Mix sur de la glace. Mélangez le composant Agendia NGS dA Tailing Master Mix au vortex pendant 15 secondes à haute vitesse. Ajoutez 20 µl à chaque puits de la plaque contenant 20 µl de surnageant. Mélangez au vortex, passez rapidement à la centrifugeuse et conservez sur de la glace.				
2.34	Exécutez le programme suivant du thermocycleur : N'utilisez pas le couvercle thermique. Si le couvercle thermique ne peut être désactivé, le programme doit être exécuté avec le couvercle ouvert. 1. 30 minutes à 37 °C 2. Au moins trois minutes à 4 °C Conservez à 4 °C ou sur de la glace jusqu'à utilisation.				
Ligature des adaptateurs					
2.35	Décongelez le composant Agendia NGS Ligation Master Mix dans de la glace. Décongelez le composant Agendia NGS Oligo Adaptor Mix sur de la glace. Préparez le composant Adaptor Ligation Mix conformément au tableau ci-dessous. Remarque : mélangez chaque réactif au vortex pendant 10 secondes.				
	<table> <tr> <th>Réactif</th><th>Volume par réaction</th></tr> <tr> <td>Agendia NGS Ligation Master Mix</td><td>5 µl</td></tr> </table>	Réactif	Volume par réaction	Agendia NGS Ligation Master Mix	5 µl
Réactif	Volume par réaction				
Agendia NGS Ligation Master Mix	5 µl				

	<i>Agendia NGS Oligo Adaptor Mix</i>	5 µl
	<i>Volume total</i>	10 µl
	Mélangez au vortex, passez rapidement à la centrifugeuse et conservez sur de la glace. Pour les petits lots d'échantillon, les réactifs peuvent être ajoutés individuellement à chaque puits d'échantillon. Si vous ajoutez les réactifs individuellement, videz doucement une pipette de composant Agendia NGS Ligation Master Mix afin que le volume soit entièrement distribué.	
2.36	Placez la plaque d'adénylation/de ligature sur de la glace et ajoutez 10 µl de composant Adaptor Ligation Mix à chaque puits d'échantillon. Fermez la plaque, mélangez au vortex et passez rapidement à la centrifugeuse.	
2.37	Exécutez le programme suivant du thermocycleur : N'utilisez pas le couvercle thermique. Si le couvercle thermique ne peut être désactivé, le programme doit être exécuté avec le couvercle ouvert. 1. 15 minutes à 20 °C 2. Au moins trois minutes à 4 °C Conservez à 4 °C ou sur de la glace jusqu'à utilisation.	

Purification de l'ADNc ligaturé par adaptateur à l'aide de billes AMPure XP Beads		
2.38	Laissez les billes AMPure XP Beads à température ambiante pendant au moins 30 minutes. Mélangez la suspension de billes au vortex jusqu'à ce qu'elle soit homogène. Décongelez le composant Agendia NGS PCR Master Mix à température ambiante. Placez dans la glace une fois décongelé. Décongelez les composants Agendia NGS Uracil DNA Glycosylase (UDG) , Agendia NGS Forward PCR Primer et Agendia NGS Reverse PCR Primer dans de la glace.	
2.39	Ajoutez 90 µl de suspension de billes homogène à chaque puits d'une nouvelle plaque MIDI à 96 puits de 0,8 ml.	
2.40	Transférez 50 µl du mélange de l'échantillon dans le puits correspondant de la plaque MIDI à 96 puits de 0,8 ml.	
2.41	Fermez la plaque, mélangez au vortex et passez rapidement à la centrifugeuse.	
2.42	Incubez les échantillons pendant cinq minutes à température ambiante.	
2.43	Placez la plaque sur le support magnétique à température ambiante pendant au moins cinq minutes.	
2.44	Tandis que la plaque se trouve sur le support magnétique, retirez et jetez délicatement la solution claire de chaque puits. Ne touchez pas les billes lors du retrait de la solution.	
2.45	Tandis que la plaque se trouve sur le support magnétique, versez 200 µl d'éthanol à 70 % frais dans chaque puits.	
2.46	Attendez 10 secondes (ou jusqu'à ce que la solution soit claire), le temps que les billes déplacées retombent, et retirez délicatement l'éthanol.	
2.47	Répétez pour un total de deux lavages.	
2.48	Si nécessaire, passez rapidement la plaque MIDI à la centrifugeuse, remettez la plaque sur le support magnétique et retirez les gouttelettes d'éthanol restantes à l'aide d'une pipette.	
2.49	Faites sécher les échantillons sur le bloc thermique à 37 °C pendant trois minutes. Ne faites pas trop sécher les échantillons. Veillez cependant à ce qu'il n'y ait plus d'éthanol.	
2.50	Ajoutez 23 µl d'eau sans nucléase à chaque puits d'échantillon.	
2.51	Fermez la plaque, mélangez bien au vortex et passez rapidement la plaque à la centrifugeuse pour recueillir le liquide.	
2.52	Incubez pendant deux minutes à température ambiante.	
2.53	Placez la plaque MIDI sur le support magnétique et incubez pendant cinq minutes ou jusqu'à ce que la solution soit claire.	
2.54	Retirez 22 µl de surnageant et ajoutez-le à une nouvelle plaque à 96 puits de 0,2 ml.	

Amplification de la banque d'ADNc ligaturé par adaptateur
--

2.55	Préparez le composant Pre-Capture PCR Mix sur de la glace conformément au tableau ci-dessous.	
	Remarque : mélangez le réactif Agendia NGS PCR Master Mix au vortex pendant 30 secondes avant l'association.	
	Réactif	Volume par réaction
	Agendia NGS PCR Master Mix	25 µl
	Agendia NGS Uracil DNA Glycosylase (UDG)	1 µl
	Agendia NGS Forward PCR Primer	1 µl
	Agendia NGS Reverse PCR Primer	1 µl
<i>Volume total</i>		28 µl
Mélangez au vortex, passez rapidement à la centrifugeuse et conservez sur de la glace.		
2.56	Ajoutez 28 µl de composant Pre-Capture PCR Mix à chaque puits d'échantillon. Fermez la plaque, mélangez au vortex et passez rapidement à la centrifugeuse.	

2.57	Exécutez le programme suivant du thermocycleur : Couvercle thermique à 95 °C 1. 15 minutes à 37 °C 2. Deux minutes à 95 °C 3. 30 secondes à 95 °C 4. 30 secondes à 65 °C 5. Une minute à 72 °C 6. Répétez les étapes 3 à 5 pour un total de 14 cycles. 7. Cinq minutes à 72 °C 8. Au moins trois minutes à 4 °C Conservez à 4 °C ou sur de la glace jusqu'à utilisation.
------	--

Purification de l'ADNc ligaturé par adaptateur amplifié à l'aide de billes AMPure XP Beads	
2.58	Laissez les billes AMPure XP Beads à température ambiante pendant au moins 30 minutes. Mélangez la suspension de billes au vortex jusqu'à ce qu'elle soit homogène.
2.59	Ajoutez 90 µl de suspension de billes homogène à chaque puits d'une nouvelle plaque MIDI à 96 puits de 0,8 ml.
2.60	Transférez 50 µl du mélange de l'échantillon dans le puits correspondant de la plaque MIDI à 96 puits de 0,8 ml.
2.61	Fermez la plaque, mélangez au vortex et passez rapidement à la centrifugeuse.
2.62	Incubez les échantillons pendant cinq minutes à température ambiante.
2.63	Placez la plaque sur le support magnétique à température ambiante pendant au moins cinq minutes.
2.64	Tandis que la plaque se trouve sur le support magnétique, retirez et jetez délicatement la solution claire de chaque puits. Ne touchez pas les billes lors du retrait de la solution.
2.65	Tandis que la plaque se trouve sur le support magnétique, versez 200 µl d'éthanol à 70 % frais dans chaque puits.
2.66	Attendez 10 secondes (ou jusqu'à ce que la solution soit claire), le temps que les billes déplacées retombent, et retirez délicatement l'éthanol.
2.67	Répétez pour un total de deux lavages.
2.68	Si nécessaire, passez rapidement la plaque MIDI à la centrifugeuse, remettez la plaque sur le support magnétique et retirez les gouttelettes d'éthanol restantes à l'aide d'une pipette.
2.69	Faites sécher les échantillons sur le bloc thermique à 37 °C pendant trois minutes. Ne faites pas trop sécher les échantillons. Veillez cependant à ce qu'il n'y ait plus d'éthanol.
2.70	Ajoutez 26 µl d'eau sans nucléase à chaque puits d'échantillon.
2.71	Fermez la plaque, mélangez bien au vortex et passez rapidement la plaque à la centrifugeuse pour recueillir le liquide.
2.72	Incubez pendant deux minutes à température ambiante.
2.73	Placez la plaque MIDI sur le support magnétique et incubez pendant cinq minutes ou jusqu'à ce que la solution soit claire.
2.74	Retirez 25 µl de surnageant et ajoutez-le à une nouvelle plaque à 96 puits de 0,2 ml.
Point d'arrêt : si vous ne passez pas à l'étape suivante, fermez la plaque et stockez-la à une température comprise entre -15 °C et -25 °C.	
Quantification et normalisation de l'ADNc ligaturé par adaptateur amplifié	
2.75	Quantifiez la banque de pré-capture de l'ADNc ligaturé par adaptateur amplifié à l'aide d'une plate-forme d'analyse de fragments d'acide nucléique adaptée, dans une plage comprise entre 150 et 550 bp. Prélevez un total de 200 ng de la banque de pré-capture de l'ADNc.
2.76	À l'aide d'une centrifugeuse sous vide, lyophilisez les 200 ng de la banque de pré-capture de l'ADNc et reconstituez dans 3,4 µl d'eau sans nucléase. <u>Ne faites pas trop sécher</u> . Mélangez bien au vortex et passez rapidement à la centrifugeuse.
Point d'arrêt : si vous ne passez pas à l'étape suivante, stockez les tubes à une température comprise entre -15 °C et -25 °C.	

Étape 3 : enrichissement de cibles NGS Agendia

Hybridation de la banque

3.1

Préparez un seau de glace et décongelez les réactifs comme indiqué ci-dessous :

Mix A Hyb Buffer	Mix B Prepped Library	Mix C Capture Library
<i>Agendia NGS Hyb 1</i> Température ambiante	<i>Agendia NGS Indexing Block 1</i> 4 °C (glace)	<i>Agendia NGS RNase Block</i> Ne retirez le composant stocké à -20 °C que lors de la préparation du composant Mix C.
<i>Agendia NGS Hyb 2</i> Température ambiante	<i>Agendia NGS Block 2</i> 4 °C (glace)	<i>MammaPrint BluePrint NGS Baits Library</i> 4 °C (glace)
<i>Agendia NGS Hyb 3</i> Température ambiante	<i>Agendia NGS Indexing Block 3</i> 4 °C (glace)	-
<i>Agendia NGS Hyb 4</i> Température ambiante	-	-

3.2

Préparez le composant **Library Mix A** conformément au **tableau ci-dessous**, dans un tube de 1,5 ml à température ambiante.

Réactif	Volume par réaction
<i>Agendia NGS Hyb 1</i>	6,63 µL
<i>Agendia NGS Hyb 2</i>	0,27 µL
<i>Agendia NGS Hyb 3</i>	2,65 µL
<i>Agendia NGS Hyb 4</i>	3,45 µL
Volume total	13,0 µL

Mélangez délicatement au vortex, passez rapidement à la centrifugeuse et conservez à température ambiante.

3.3

Préparez une nouvelle bande de 8 tubes, apposez une étiquette **A** et versez **13 µl** par échantillon de composant **Library Mix A** dans chaque puits.

Conservez les tubes par bande à température ambiante.

3.4

Préparez le composant **Library Mix B** conformément au **tableau ci-dessous**, dans un tube de 0,5 ml sur de la glace.

Réactif	Volume par réaction
<i>Agendia NGS Indexing Block 1</i>	2,5 µL
<i>Agendia NGS Block 2</i>	2,5 µL
<i>Agendia NGS Indexing Block 3</i>	0,6 µL
Volume total	5,6 µL

Mélangez délicatement au vortex, passez rapidement à la centrifugeuse et conservez sur de la glace.

3.5

Préparez une nouvelle bande de 8 tubes, apposez une étiquette **B** et

1. Versez **5,6 µl** de composant **Library Mix B** dans chaque puits.

2. Ajoutez **3,4 µl** d'échantillon dans chaque puits correspondant.

3. Mélangez délicatement en remplissant et en vidant une pipette dix fois.

3.6

Placez la bande de 8 tubes contenant le composant **Library Mix B et l'échantillon** dans un thermocycleur et exécutez le programme suivant :

Couvercle thermique à 105 °C, le volume doit être réglé sur **29 µl**, le cas échéant.

1. Cinq minutes à 95 °C

2. Cinq minutes à 65 °C

3. Maintenez à 65 °C.

3.7	Préparez le composant Library Mix C conformément au tableau ci-dessous , dans un tube de 0,5 ml dans de la glace à 4 °C.	
	Réactif	Volume par réaction
	Agendia NGS Nuclease-Free Water	4,5 µL
	Agendia NGS RNase Block	0,5 µL
	MammaPrint Blueprint NGS Baits Library	2,0 µL
	Volume total	7,0 µL
	Mélangez délicatement en remplissant et en vidant une pipette. Assurez-vous de l'absence de bulles. Remarque : préparez le composant Mix C lorsque vous atteignez les cinq minutes à 65 °C à l'étape 3.6. Laissez brièvement le mélange à température ambiante, jusqu'à l'ajout du composant Mix A au composant Mix C. Ne laissez pas les solutions contenant du composant MammaPrint Blueprint NGS Baits Library à température ambiante pendant des périodes prolongées.	
3.8	Apposez une étiquette C sur une nouvelle bande de 8 tubes et ajoutez 7 µl de composant Library Mix C dans chaque puits de la bande de 8 tubes.	
3.9	Videz une pipette de 13 µl de composant Library Mix A dans la bande de 8 tubes contenant le composant Library Mix C . Mélangez bien au vortex pendant cinq secondes et passez rapidement à la centrifugeuse. Conservez brièvement le mélange à température ambiante jusqu'à ce que vous l'utilisiez à l'étape 3.10.	
3.10	Tout en maintenant le thermocycleur à 65 °C, videz entièrement la pipette de composant Library Mix A+C dans les puits d'échantillon contenant le composant Library Mix B . Veillez à ce que le composant Library Mix A+C soit entièrement transféré dans le composant Library Mix B .	
3.11	Mélangez délicatement en remplissant et en vidant une pipette dix fois et fermez le couvercle. En présence de bulles, passez rapidement à la centrifugeuse.	
3.12	Veillez à ce que tous les tubes soient fermés. Fermez le couvercle du thermocycleur et exécutez la suite du programme : 1. 17 à 24 heures à 65 °C 2. Maintenez à 65 °C.	

Préparation des billes Streptavidin	
3.13	Mélangez au vortex et versez 650 µl de composant Agendia NGS Wash Buffer 2 par échantillon dans des tubes de 2 ml.
3.14	Placez les tubes prélevés dans un bloc thermique à 65 °C pendant au moins 30 minutes.
3.15	Mélangez les billes Dynabeads MyOne Streptavidin T1 au vortex pendant au moins 30 secondes pour supprimer les grumeaux.
3.16	Versez 50 µl de billes par échantillon dans des tubes de 2 ml (200 µl de billes maximum pour quatre échantillons, par tube).
3.17	Lavez les billes Streptavidin : a. Ajoutez 200 µl de composant Agendia NGS Binding Buffer PAR ÉCHANTILLON dans le tube de 2 ml (800 µl de tampon maximum pour quatre échantillons, par tube). b. Mélangez les billes sur un agitateur vortex pendant cinq secondes et passez rapidement à la centrifugeuse. c. Placez les tubes de 2 ml sur un séparateur magnétique pendant deux minutes, le temps que la solution devienne claire. d. Retirez et jetez le surnageant.

	e. Répétez les étapes a. à d. pour un total de trois lavages.
3.18	Remettez les billes en suspension dans 200 µl par échantillon de composant Agendia NGS Binding Buffer et versez-les dans des bandes PCR de 8 tubes.

Capture d'hybrides à l'aide de billes Streptavidin	
3.19	Tout en maintenant les échantillons à 65 °C sur le thermocycleur, transférez 29 µl de l'incubation banque d'hybridation 17-24 heures dans un tube par bande de 8 contenant 200 µl de billes Streptavidin lavées (les billes Streptavidin lavées doivent être conservées à température ambiante).
3.20	Fermez la bande de 8 tubes, mélangez en la retournant et passez rapidement à la centrifugeuse.

3.21	Incubez l'échantillon sur l'agitateur thermique à 27 °C et 1 400 tr/minute pendant 30 minutes. Remarque : assurez-vous que les billes ne forment pas de grumeaux au bout de cinq minutes. Si des grumeaux se sont formés, mélangez rapidement le tube au vortex. À l'issue des 30 minutes d'incubation, réglez l'agitateur thermique sur 65 °C.
3.22	Passez rapidement les tubes à la centrifugeuse.
3.23	Placez la plaque sur un séparateur magnétique pendant deux minutes pour recueillir les billes de la suspension.
3.24	Retirez et jetez le surnageant.
3.25	Remettez les billes en suspension dans 200 µl de composant Agendia NGS Wash Buffer 1 en mélangeant sur un agitateur vortex pendant cinq secondes.
3.26	Incubez les échantillons pendant 15 minutes à température ambiante.
3.27	Séparez les billes et le tampon sur un séparateur magnétique pendant deux minutes et retirez le surnageant.
3.28	Lavez les billes avec le composant Agendia NGS Wash Buffer 2 : a. Remettez les billes en suspension dans 200 µl de composant Agendia NGS Wash Buffer 2 préchauffé à 65 °C. b. Fermez les tubes et mélangez sur un agitateur vortex pendant cinq secondes pour remettre les billes en suspension. Passez rapidement à la centrifugeuse. c. Incubez les tubes sur un agitateur thermique à 65 °C et 1 200 tr/minute pendant 10 minutes. d. Retournez les tubes pour mélanger si vous remarquez que les billes se déposent. e. Passez rapidement les tubes dans une centrifugeuse ou une centrifugeuse de mini-plaques. f. Placez les tubes sur un séparateur magnétique pendant deux minutes. g. Retirez et jetez le surnageant. h. Répétez les étapes a. à g. pour un total de trois lavages.
3.29	Mélangez les billes au vortex dans 31,5 µl de composant Agendia NGS Elution Buffer pendant cinq secondes pour remettre les billes en suspension. Passez rapidement à la centrifugeuse.
3.30	Incubez les échantillons pendant 10 minutes à température ambiante.
3.31	Séparez les billes et le tampon sur le séparateur magnétique pendant deux minutes.
3.32	Transférez 30 µl de surnageant sur une plaque fraîche. Jetez les billes.
3.33	Ajoutez 30 µl de composant Agendia NGS Neutralization Buffer à la banque d'ADNc capturé.

Purification de la banque capturée à l'aide de billes AMPure XP Beads	
3.34	Laissez les billes AMPure XP Beads à température ambiante pendant au moins 30 minutes. Mélangez la suspension de billes au vortex jusqu'à ce qu'elle soit homogène. Si vous procédez à l' amplification des banques capturées pour ajouter des balises d'indices , décongelez les composants Agendia NGS PCR Master Mix , Agendia NGS Post-Capture PCR Primer et Agendia NGS 8bp Index Plate et placez-les dans de la glace.
3.35	Ajoutez 108 µl de suspension de billes homogène à chaque puits d'une nouvelle plaque MIDI à 96 puits de 0,8 ml.
3.36	Ajoutez les 60 µl de mélange d'échantillon de l'étape 3.33.
3.37	Fermez la plaque, mélangez au vortex et passez rapidement à la centrifugeuse.
3.38	Incubez les échantillons pendant cinq minutes à température ambiante.
3.39	Placez la plaque sur le support magnétique à température ambiante pendant au moins cinq minutes.

3.40	Tandis que la plaque se trouve sur le support magnétique, retirez et jetez délicatement la solution claire de chaque puits. Ne touchez pas les billes lors du retrait de la solution.
3.41	Tandis que la plaque se trouve sur le support magnétique, versez 200 µl d'éthanol à 70 % frais dans chaque puits.
3.42	Attendez 10 secondes (ou jusqu'à ce que la solution soit claire), le temps que les billes déplacées retombent, et retirez délicatement l'éthanol.
3.43	Répétez pour un total de deux lavages.
3.44	Si nécessaire, passez rapidement la plaque MIDI à la centrifugeuse, remettez la plaque sur le support magnétique et retirez les gouttelettes d'éthanol restantes à l'aide d'une pipette.
3.45	Faites sécher les échantillons sur le bloc thermique à 37 °C pendant trois minutes. Ne faites pas trop sécher les échantillons. Veillez cependant à ce qu'il n'y ait plus d'éthanol.
3.46	Ajoutez 36 µl d'eau sans nucléase à chaque puits d'échantillon.
3.47	Fermez la plaque, mélangez bien au vortex et passez rapidement la plaque à la centrifugeuse pour recueillir le liquide.
3.48	Incubez pendant deux minutes à température ambiante.
3.49	Placez la plaque MIDI sur le support magnétique et incubez pendant cinq minutes ou jusqu'à ce que la solution soit claire.
3.50	Retirez 35 µl de surnageant et ajoutez-le à une nouvelle plaque à 96 puits de 0,2 ml ou à de nouveaux tubes.
Point d'arrêt : si vous ne passez pas à l'étape suivante, fermez la plaque et stockez-la à une température comprise entre -15 °C et -25 °C.	

Amplification des banques capturées pour ajouter des balises d'indices									
3.51	Décongelez les composants Agendia NGS PCR Master Mix, Agendia NGS Post-Capture PCR Primer et Agendia NGS 8bp Index Plate et placez-les dans de la glace. Remarque : le composant Agendia NGS PCR Master Mix est visqueux, mélangez au vortex pendant 30 secondes avant d'ajouter les amorces PCR. Préparez le composant Post-Capture PCR Mix conformément au tableau ci-dessous, dans un tube de 1,5 ml dans de la glace. <table border="1"> <thead> <tr> <th>Réactifs</th><th>Volume par réaction</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Agendia NGS PCR Master Mix</td><td>25 µl</td></tr> <tr> <td>Agendia NGS Post-Capture PCR Primer</td><td>1 µl</td></tr> <tr> <td>Volume total</td><td>26 µl</td></tr> </tbody> </table> Mélangez délicatement au vortex et passez le mélange à la centrifugeuse. Conservez sur de la glace.	Réactifs	Volume par réaction	Agendia NGS PCR Master Mix	25 µl	Agendia NGS Post-Capture PCR Primer	1 µl	Volume total	26 µl
Réactifs	Volume par réaction								
Agendia NGS PCR Master Mix	25 µl								
Agendia NGS Post-Capture PCR Primer	1 µl								
Volume total	26 µl								
3.52	Pour chaque échantillon à amplifier, placez 26 µl de composant Post-Capture PCR Mix dans le puits d'une plaque PCR.								
3.53	Ajoutez 5 µl de l'amorce d'indexage adaptée (de la plaque Agendia NGS 8bp Index Plate) dans chaque puits contenant le composant Post-Capture PCR Mix. Utilisez une amorce d'indexage différente pour chaque échantillon à séquencer d'une même ligne.								
3.54	Ajoutez 19 µl de la banque purifiée à l'étape 3.50 à chaque puits contenant le composant Post-Capture PCR Mix . Mélangez en remplissant et en vidant une pipette dix fois. Passez rapidement la plaque à la centrifugeuse.								
3.55	Placez la plaque PCR dans un thermocycleur. Exécutez le programme suivant du thermocycleur : Couvercle thermique à 105 °C								

- | | |
|--|--|
| | <ol style="list-style-type: none">1. Deux minutes à 95 °C2. 30 secondes à 95 °C3. 30 secondes à 57 °C4. Une minute à 72 °C5. Répétez les étapes 2 à 4 pour un total de 12 cycles.6. Cinq minutes à 72 °C7. Conservez à 4 °C. |
|--|--|

Purification des banques capturées amplifiées à l'aide de billes AMPure XP Beads	
3.56	Laissez les billes AMPure XP Beads à température ambiante pendant au moins 30 minutes. Mélangez la suspension de billes au vortex jusqu'à ce qu'elle soit homogène.
3.57	Ajoutez 90 µl de suspension de billes homogène à chaque puits d'une nouvelle plaque MIDI à 96 puits de 0,8 ml.
3.58	Transférez 50 µl du mélange de l'échantillon dans le puits correspondant de la plaque MIDI à 96 puits de 0,8 ml.
3.59	Fermez la plaque, mélangez au vortex et passez rapidement à la centrifugeuse.
3.60	Incubez les échantillons pendant cinq minutes à température ambiante.
3.61	Placez la plaque sur le support magnétique à température ambiante pendant au moins cinq minutes.
3.62	Tandis que la plaque se trouve sur le support magnétique, retirez et jetez délicatement la solution claire de chaque puits. Ne touchez pas les billes lors du retrait de la solution.
3.63	Tandis que la plaque se trouve sur le support magnétique, versez 200 µl d'éthanol à 70 % frais dans chaque puits.
3.64	Attendez 10 secondes (ou jusqu'à ce que la solution soit claire), le temps que les billes déplacées retombent, et retirez délicatement l'éthanol.
3.65	Répétez pour un total de deux lavages.
3.66	Si nécessaire, passez rapidement la plaque MIDI à la centrifugeuse, remettez la plaque sur le support magnétique et retirez les gouttelettes d'éthanol restantes à l'aide d'une pipette.
3.67	Faites sécher les échantillons sur le bloc thermique à 37 °C pendant trois minutes. Ne les faites pas trop sécher. Veillez cependant à ce qu'il n'y ait plus d'éthanol.
3.68	Ajoutez 22,5 µl de composant Buffer EB à chaque puits d'échantillon.
3.69	Fermez la plaque, mélangez bien au vortex et passez rapidement la plaque à la centrifugeuse pour recueillir le liquide.
3.70	Incubez pendant deux minutes à température ambiante.
3.71	Placez la plaque MIDI sur le support magnétique et incubez pendant cinq minutes ou jusqu'à ce que la solution soit claire.
3.72	Retirez 21 µl de surnageant et ajoutez-le à une nouvelle plaque à 96 puits ou à de nouveaux tubes.
Point d'arrêt : si vous ne passez pas à l'étape suivante, fermez la plaque et stockez les 21 µl de banques indexées à une température comprise entre -15 °C et -25 °C.	

Contrôle qualité 3 : évaluation de la qualité des banques indexées, aux cibles enrichies et amplifiées

Vérifiez la répartition des tailles de chaque banque indexée, capturée et amplifiée à l'aide d'une plateforme d'analyse de fragments d'acide nucléique adaptée. La répartition des tailles de fragments doit être comprise entre 150 et 700 bp. Pour une quantification précise, veillez à ce que la concentration soit conforme à la plage linéaire du test (de 5 à 500 pg/µl).

Molarité de la base [pmol/l]	Cible de molarité [nM]
≥ 4000	4
2000-3999	2

1000-1999	1
Inférieure à 1 000	Le test ne doit pas être effectué, mauvais échantillon

Étape 4 : chargement du séquenceur MiSeq MGS Agendia

Préparation de la fiche d'échantillon

- 4.1 Préparez la fiche d'échantillon MiSeq au format CSV (valeurs séparées par des virgules) conformément aux consignes suivantes.
Il s'agit d'un protocole à une extrémité de 150 bp.
Veuillez vous reporter au guide de référence d'Illumina disponible sous https://support.illumina.com/downloads/miseq_sample_sheet_quick_reference_guide_15028392.html pour obtenir des consignes générales.
Un exemple de fiche d'échantillon MiSeq est disponible ici : <https://diagnostic-products.agendia.com/resources/>.

Sous [Header]

Nom de l'investigateur	Obligatoire, <i>information fournie par l'utilisateur</i>
Nom du projet	Obligatoire, <i>information fournie par l'utilisateur</i>
Nom de l'expérience	Obligatoire, <i>information fournie par l'utilisateur</i>
Date	Obligatoire
Procédure de travail	Obligatoire [GenerateFASTQ]
Test	Obligatoire [SureSelect]
Chimie	Obligatoire [Default]

Sous [Reads] : 150

Sous [Settings]

OnlyGenerateFASTQ	1
FilterPCRDuplicates	0

Sous [Data]

Sample ID	Sample Name	Sample Plate	Sample Well	Sample Project	Index	I7_Index_ID
Obligatoire , <i>information fournie par l'utilisateur</i>	Facultatif	Facultatif	Facultatif	Facultatif	Obligatoire [Index Sequence]	Facultatif

Remarque : chaque échantillon doit disposer d'un identifiant Sample ID unique. L'attribut Sample Name sera inclus dans le nom des fichiers FASTQ.

Enregistrez la fiche. Le logiciel invite l'utilisateur à télécharger la fiche d'échantillon.

- 4.2 Préparez la cartouche de réactif conformément aux recommandations d'Illumina.

Pooling des banques finales pour le séquençage multiplexé

- 4.3 Le protocole de séquençage utilisé (**1 nM, 2 nM ou 4 nM**) dépend des échantillons figurant sur la fiche d'échantillon préparée. Diluez chaque échantillon individuellement en fonction de la cible de molarité (1 nM, 2 nM ou 4 nM). Si des échantillons avec différentes cibles de molarité doivent être associés lors d'une même exécution du système MiSeq, diluez tous les échantillons pour atteindre la plus faible cible de molarité commune et procédez au pooling.

- 4.4 Ajoutez **5 µl** de chaque échantillon normalisé à un tube de 1,5 ml.

4.5	Mélangez au vortex, passez rapidement à la centrifugeuse et placez dans de la glace.
-----	--

Dénaturation de la banque d'ADNc en pool				
4.6	Préparez un tube frais de NaOH 0,2 N (le NaOH 0,2 N reste stable pendant 12 heures maximum). Dénaturez la banque en pool de l'étape 4.5 conformément au protocole de séquençage utilisé :			
		1 nM	2 nM	4 nM
	Banque en pool	10 µL	5 µL	5 µL
	NaOH 0,2 N	10 µL	5 µL	5 µL
4.7	Mélangez rapidement au vortex et passez à la centrifugeuse à 280 × g pendant une minute à température ambiante.			
4.8	Incubez à température ambiante pendant cinq minutes.			
Dilution de la banque d'ADNc dénaturé				
4.9	Diluez la banque d'ADNc dénaturé de l'étape 4.8 avec le tampon HT1 préalablement refroidi conformément au protocole de séquençage utilisé :			
	Remarque : retournez le tampon HT1 pour le mélanger.			
		1 nM	2 nM	4 nM
	Banque d'ADNc dénaturé	20 µL	10 µL	10 µL
	HT1	480 µL	490 µL	990 µL
	Concentration	20 pM	20 pM	20 pM
4.10	Retournez plusieurs fois pour mélanger, passez rapidement à la centrifugeuse et posez sur de la glace.			
4.11	Dans un nouveau tube de 1,5 ml, diluez la banque diluée dénaturée de l'étape 4.10 conformément au protocole de séquençage pour obtenir la concentration finale souhaitée.			
		1 nM	2 nM	4 nM
	ADN dénaturé	500 µL	500 µL	450 µL
	HT1	167 µL	167 µL	150 µL
		Concentration finale	15 pM	15 pM
4.12	Retournez plusieurs fois pour mélanger et passez rapidement à la centrifugeuse. Placez dans de la glace jusqu'au chargement dans la cartouche de réactif MiSeq.			
Association de la banque d'échantillons et du réactif PhiX Control				
4.13	Préparez 20 pM de réactif PhiX conformément au protocole MiSeq d'Illumina ou décongelez 20 pM de la banque PhiX (si elle a été précédemment préparée) sur de la glace. Retournez pour mélanger et passez rapidement à la centrifugeuse.			
4.14	Associez les volumes suivants de réactif PhiX Control et de la banque d'échantillons de l'étape 4.12 dans un tube de 1,5 ml : a. 6 µl de la banque PhiX 20 pM diluée et dénaturée, b. 594 µl de la banque d'échantillons diluée et dénaturée (si aucun réactif PhiX n'est ajouté, ajoutez 600 µl de la banque d'échantillons diluée et dénaturée).			
4.15	Retournez plusieurs fois pour mélanger et passez rapidement à la centrifugeuse. Mettez de côté dans de la glace jusqu'au chargement dans la cartouche de réactif MiSeq.			
Séquençage sur le système MiSeq				
4.16	Sur l'écran de bienvenue de l'interface du logiciel, sélectionnez Sequence pour lancer les étapes de configuration de l'exécution du séquençage.			
4.17	Si vous utilisez Windows 7 a. Sélectionnez la commande Change Sample Sheet au niveau de l'écran Load Reagents de manière à ce que le logiciel utilise la fiche d'échantillon adaptée. b. Sélectionnez Browse pour accéder à la fiche d'échantillon et sélectionnez Open.			

	c. Sélectionnez Save and Continue, puis Next pour vérifier les paramètres d'exécution. d. Procédez au chargement du réactif MiSeq.
4.18	Si vous utilisez Windows 10 a. Au niveau de l'écran Run Setup Option, sélectionnez l'option Sample Sheet. b. [Facultatif] Sélectionnez Use BaseSpace™ Sequence Hub for this run et connectez-vous pour utiliser BaseSpace. c. Sinon, sélectionnez Next et accédez au fichier de la fiche d'échantillon (.csv). Le fichier est envoyé au Local Run Manager pour validation ou exécution. d. [Facultatif] Sélectionnez Disable Local Run Manager Secondary Analysis pour désactiver l'analyse secondaire du Local Run Manager. e. Si nécessaire, résolvez les erreurs de la fiche d'échantillon. f. Sélectionnez Next et procédez au chargement de la cellule de débit.
4.19	Procédez au séquençage conformément au protocole de séquençage MiSeq d'Illumina pour générer des fichiers FASTQ. Pour plus d'informations sur le système MiSeq, reportez-vous au guide système d'Illumina : https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq/documentation.html

Étape 5 : analyse des fichiers FASTQ via le logiciel ADAPT

Les fichiers FASTQ générés par le séquenceur MiSeq seront traités par le logiciel ADAPT (Agendia Data Analysis Pipeline Tool), une plate-forme d'analyse génomique dans le cloud, sécurisée et hautes performances. Le logiciel ADAPT est conçu pour être utilisé en association avec le kit de diagnostic in vitro du risque de récurrence du cancer du sein et de sous-typage moléculaire MammaPrint® Blueprint® (kit MammaPrint Blueprint). Le logiciel ADAPT fournit une analyse intégrée et un rapport de résultats pour les échantillons traités avec le kit NGS MammaPrint Blueprint.

Des consignes étape par étape sont fournies dans le guide d'utilisation du logiciel ADAPT-CE (EM-002), les procédures de création d'un compte, d'installation d'un connecteur de fichiers sécurisé, de téléchargement et d'analyse des données patient anonymisées dans un environnement sécurisé et de récupération des résultats des tests sont également détaillées.

Le logiciel ADAPT est un système basé dans le cloud sécurisé qui est accessible via les navigateurs répertoriés ci-dessous.

Navigateur	Version prise en charge	Système d'exploitation
Google, Chrome et Mozilla Firefox	Version stable la plus récente	Windows, Mac et Linux

Prenez connaissance de toutes les consignes fournies dans le guide d'utilisation du logiciel ADAPT-CE (EM-002) avant de commencer. Si vous avez des questions à l'issue de la lecture des consignes, veuillez contacter l'assistance produits d'Agendia (NGS.support@agendia.com) pour obtenir de l'aide.

Résultats

L'utilisateur recevra deux documents par échantillon : le rapport technique et l'explication des résultats. Le rapport technique contient des informations au sujet de l'échantillon et du traitement par le logiciel ADAPT, y compris les informations relatives au contrôle qualité et les résultats du kit NGS MammaPrint Blueprint, qui incluent l'indice MammaPrint (IMP), la détermination du risque de récurrence (risque élevé ou faible risque) et les résultats du test Blueprint (type luminal, HER2 ou basal). Reportez-vous à la section Interprétation des résultats pour des informations plus détaillées. L'explication des résultats présente les résultats du test dans le contexte des données cliniques publiées.

Interprétation des résultats

Les résultats du test ne sont considérés comme valables que si le champ d'évaluation générale du rapport technique porte la mention Réussite. En cas d'échec de l'une des mesures du contrôle qualité, le champ d'évaluation générale du rapport technique indique Échec. Si le champ d'évaluation générale indique Échec, le rapport technique stipule qu'il n'est pas possible de fournir des résultats pour ce spécimen dans la section des résultats du test et le document d'explication des résultats n'est pas fourni. Le laboratoire peut décider de tester de nouveau l'échantillon afin de déterminer si le résultat suivant permet l'obtention d'un résultat de test valable.

MammaPrint

Les résultats du test MammaPrint sont fournis sous forme de résultats binaires : ils indiquent un faible risque ou un haut risque de récurrence. Le profil pronostique (faible risque ou haut risque) de l'échantillon est déterminé en calculant l'indice IMP sur une échelle de -1 000 à +1 000 (plage de validité FFIP MammaPrint, illustration 2). Les résultats qui indiquent un haut risque ont un indice MammaPrint (IMP) égal ou inférieur à 0 alors que l'indice IMP des résultats qui indiquent un risque faible est supérieur à 0. Si l'indice IMP est inclus dans une plage prédéfinie de valeurs limites de classification (entre -0,058 et +0,058), la précision de classification est inférieure à 90 %.

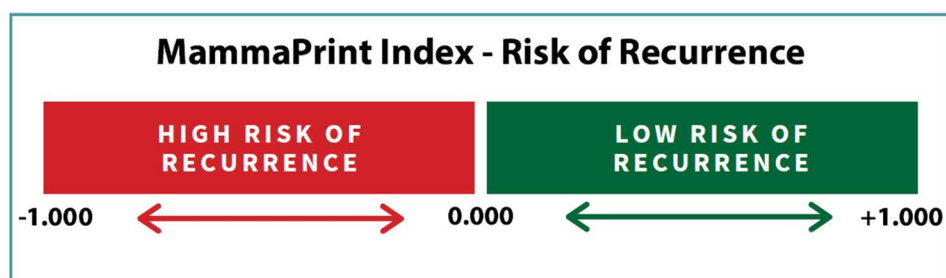


Illustration 2 : indice MammaPrint

BluePrint

BluePrint est un test de sous-typage moléculaire qui classe le cancer du sein en trois sous-types distincts : type luminal, type HER2 et type basal grâce à la détermination des taux d'ARNm de 80 gènes qui permet d'établir au mieux une distinction entre ces trois sous-types moléculaires particuliers. Chacun ayant des différences marquées dans l'issue à long terme et la réponse à une chimiothérapie néo-adjuvante [10]. L'association de MammaPrint et de BluePrint permet une stratification des patientes dans les sous-groupes suivants : type luminal/faible risque selon MammaPrint (correspondant au type luminal A), type luminal/haut risque selon MammaPrint (correspondant au type luminal B), type HER2 et type basal.

Limitations de la procédure

- L'utilisation du kit de diagnostic in vitro du risque de récurrence du cancer du sein et de sous-typage moléculaire MammaPrint BluePrint a uniquement été validée avec du tissu tumoral cancéreux du sein FFIP de patientes. Le test d'autres types de spécimens ou d'autres méthodes de conservation n'a pas été évalué.
- L'utilisation du kit RNeasy FFPE Kit a été validée dans le cadre de ce test. L'utilisation d'autres kits d'isolement d'ARN n'a pas été évaluée.
- Le kit NGS MammaPrint BluePrint a été validé en association avec des réactifs Illumina MiSeq V3 pour 150 cycles. L'utilisation d'autres séquenceurs d'ADN ou d'autres réactifs n'a pas été évaluée.
- Un résultat Faible risque du test MammaPrint ne garantit pas l'absence de récurrence du cancer du sein dans les cinq ans. De même, un résultat Haut risque ne signifie pas une récurrence certaine du cancer du sein. Les résultats du test doivent être utilisés en association avec des facteurs clinicopathologiques.
- Les résultats du test NGS MammaPrint BluePrint doivent être utilisés par les médecins et interprétés parallèlement à d'autres facteurs clinicopathologiques standard. Le test n'est pas conçu pour déterminer l'issue de la maladie.

Valeurs attendues

MammaPrint

Les données cliniques d'études de population ont démontré l'utilité clinique du test MammaPrint au sein de la population visée par l'utilisation. L'utilisation du test MammaPrint chez des patientes atteintes d'un cancer du sein au stade précoce (I, II ou III), indépendamment du statut des récepteurs d'œstrogènes (ER) ou HER2, avec une taille de tumeur inférieure ou égale à 5 cm et de zéro à trois ganglions lymphatiques positifs (LN 0-3), sans spécifications pour des micro-métastases ganglionnaires, a été validée lors d'essais cliniques prospectifs. Lors de l'essai MINDACT, l'analyse primaire a indiqué que s'abstenir de chimiothérapie pour les patientes à haut risque clinique/à risque faible selon MammaPrint génomique n'a pas d'impact négatif sur l'issue. Aucun avantage significatif de la chimiothérapie systémique adjuvante à cinq ans n'a été observé pour les patientes à risque faible selon MammaPrint avec un à trois ganglions lymphatiques positifs [11]. Ces études et d'autres études publiées [8] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] ont montré que le test MammaPrint améliore la prédiction de l'issue clinique chez les femmes atteintes d'un cancer du sein au stade précoce.

BluePrint

Les cancers du sein de type basal sont caractérisés par une expression génique des cellules d'origine basale/myoépithéliale. Les cancers de type basal sont généralement « triple négatifs » (aucune surexpression ni du récepteur des œstrogènes (ER), ni du récepteur de la progestérone (PR) et la protéine HER2 est absente) et ont un profil d'expression génique spécifique. L'hormonothérapie et les traitements anti-HER2, tels que le trastuzumab et le lapatinib, ne sont pas considérés comme efficaces contre ces cancers, la chimiothérapie est cependant utile.

Les cancers du sein de type luminal sont caractérisés par une expression génique des cellules épithéliales lumbales des glandes mammaires et des canaux galactophores. Les cancers de type luminal sont généralement des tumeurs à récepteurs hormonaux positifs, susceptibles de répondre à une hormonothérapie. L'évolution clinique des patientes qui présentent un risque faible selon le test MammaPrint et un cancer du sein de type luminal devrait être similaire à celle des patientes avec un cancer de type luminal A, généralement traité par hormonothérapie, tandis que l'évolution clinique des patientes qui présentent un haut risque selon le test MammaPrint et un cancer du sein de type luminal devrait être similaire à celle des patientes avec un cancer de type luminal B, qui bénéficient généralement de traitements plus agressifs, qui peuvent inclure une chimiothérapie.

Les cancers du sein de type HER2 sont caractérisés par l'amplification ou la surexpression du locus HER2. Il s'agit généralement de tumeurs HER2 positives par détermination IHC ou FISH (positives pour HER2/neu). Ces cancers ont tendance à se développer plus rapidement et peuvent récidiver, même s'il est souvent possible de les traiter par des traitements anti-HER2.

Caractéristiques de performances

Pour évaluer la précision, la reproductibilité et la reproductibilité interlaboratoire du kit de diagnostic in vitro du risque de récurrence du cancer du sein et de sous-typage moléculaire MammaPrint Blueprint, des études de validation analytique et clinique ont été menées, les résultats sont présentés ci-dessous.

MammaPrint

Performances analytiques

La concordance entre le test MammaPrint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) et le test FFIP MammaPrint actuellement commercialisé, qui repose sur la technologie des microréseaux, a été évaluée en utilisant l'ARN de 85 échantillons FFIP. Tous les tests ont été effectués au sein du laboratoire d'Agendia à Amsterdam (Pays-Bas). Les performances de test ont été déterminées en calculant le pourcentage de concordance positif, le pourcentage de concordance négatif et la concordance totale entre les deux tests. Le pourcentage de concordance positif, le pourcentage de concordance négatif et la concordance totale étaient respectivement de 100 %, 94 % et 98 %.

La reproductibilité du test MammaPrint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) a été évaluée au fil du temps en utilisant de l'ARN isolé à partir de trois échantillons de tissu FFIP qui représentaient les deux catégories de risques du test MammaPrint (haut risque et risque faible). Les échantillons ont été analysés plusieurs fois pendant plusieurs jours par plusieurs opérateurs au sein des laboratoires d'Agendia à Amsterdam (Pays-Bas) et Irvine (Californie, États-Unis). Le test n'a été exécuté qu'une fois par jour : l'échantillon 1 avait 25 mesures, l'échantillon 2, 17 mesures et l'échantillon 3, 14 mesures. La reproductibilité relative médiane de l'indice MammaPrint était de 98 %.

La reproductibilité a été évaluée entre deux isollements d'ARN obtenu à partir du même échantillon de tissu FFIP, pour un total de 43 échantillons. Les deux isollements des 43 échantillons de tissu ont été analysés le même jour au sein du laboratoire d'Agendia à Amsterdam (Pays-Bas). La concordance des résultats du test MammaPrint entre le premier isolement et le deuxième isolement en utilisant ces 43 échantillons était de 98 %.

La reproductibilité interlaboratoire a été évaluée au sein de deux sites européens externes et du laboratoire d'Agendia à Amsterdam (Pays-Bas). L'ARN isolé à partir de 16 échantillons FFIP a été expédié aux trois sites pour être testé. Les 16 échantillons ont été répartis entre au moins deux opérateurs sur chaque site. La reproductibilité interlaboratoire a été déterminée entre les deux sites externes et Agendia. La concordance totale était de 100 %.

Plusieurs substances ont été évaluées pour déterminer les interférences possibles sur les résultats de test du kit NGS MammaPrint Blueprint (ADNg, protéinase K, actinomycine D, éthanol et hydroxyde de sodium). Les substances testées n'ont pas eu d'impact sur les résultats des tests MammaPrint et Blueprint.

La limite de détection a été déterminée sur la matière post-capture, les différents niveaux de molarité ont été obtenus sur le séquenceur MiSeq et ont permis d'obtenir une limite de détection de 0,4 nM. Le seuil de molarité de la matière capturée est de 1 nM, ce qui est bien supérieur à la limite de détection.

Performances cliniques

Les caractéristiques des performances cliniques du test MammaPrint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) ont été évaluées en utilisant une étude de cohorte de 316 échantillons de tissu cancéreux du sein FFIP qui ont été recueillis de manière prospective auprès de patientes atteintes d'un cancer du sein de niveau I ou II, avec une taille de tumeur inférieure ou égale à 5 cm et des ganglions lymphatiques négatifs ou zéro à trois ganglions lymphatiques positifs, incluses entre 2004 et 2006, et archivés. Pour soutenir les performances cliniques du test MammaPrint, les 316 échantillons ont été évalués avec les données d'issue à cinq ans pour l'intervalle sans récurrence à distance (ISR), qui correspond à la durée jusqu'au diagnostic de métastases à distance ou jusqu'au décès causé par le cancer du sein. Comme prévu, ces données ont indiqué un écart significatif entre les groupes à haut risque et à risque faible selon MammaPrint pour l'ISR à cinq ans (test de Mantel-Haenszel $p = 0,002$). Il est important de noter que les performances cliniques du test MammaPrint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) pour les groupes à haut risque et à risque faible de cette étude de cohorte étaient équivalentes sur le plan statistique (haut risque $p = 0,83$, risque faible $p = 0,44$) aux performances du test FFIP MammaPrint actuellement commercialisé, qui repose sur la technologie des microréseaux.

Enfin, une étude de corrélation sur site a été menée sur deux sites européens indépendants. Les échantillons cancéreux du sein ont été recueillis de manière prospective auprès de 95 patientes de la population visée par l'utilisation (cancer de niveau I ou II, taille de tumeur inférieure ou égale à 5 cm et ganglions lymphatiques négatifs ou zéro à trois ganglions lymphatiques positifs). Ces échantillons ont été traités sur les sites dans le cadre du test MammaPrint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) et une partie du tissu a été expédiée au laboratoire d'Agendia à Amsterdam (Pays-Bas) afin d'être testée avec le test MammaPrint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) et le test FFIP MammaPrint actuellement commercialisé, qui repose sur la technologie des microréseaux. Les performances du test ont été évaluées en comparant les résultats NGS du test MammaPrint obtenus sur les sites et les résultats FFIP MammaPrint et les résultats du test MammaPrint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) obtenus au sein d'Agendia. La concordance entre le test MammaPrint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) effectué sur les sites et le test MammaPrint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) effectué au sein d'Agendia sur 86 échantillons était de 93 %. De même, la concordance entre le test MammaPrint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) effectué sur les sites et le test FFIP MammaPrint qui repose sur la technologie des microréseaux effectué au sein d'Agendia était de 91 %.

Blueprint

Performances analytiques

La concordance entre le test Blueprint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) et le test FFIP Blueprint actuellement commercialisé, qui repose sur la technologie des microréseaux, a été évaluée en

utilisant 98 échantillons d'ARN FFIP. Tous les tests ont été effectués au sein du laboratoire d'Agendia à Amsterdam (Pays-Bas). Les performances de test ont été déterminées en calculant la concordance totale entre les deux tests, qui était de 100 %. Une autre comparaison a été effectuée entre les résultats Blueprint obtenus à partir du séquençage de nouvelle génération (NGS) et les plates-formes de microréseaux en utilisant 316 échantillons. Cette comparaison a permis d'établir une concordance totale de 98 % et une concordance pour les sous-types luminal, HER2 et basal de 100 %, 75 % et 96 % respectivement.

La reproductibilité du test Blueprint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) a été évaluée au fil du temps en utilisant de l'ARN isolé à partir de trois échantillons de tissu FFIP qui représentaient les différents résultats du test Blueprint : type luminal, type HER2 et type basal. Les échantillons ont été analysés plusieurs fois pendant plusieurs jours par plusieurs opérateurs au sein des laboratoires d'Agendia à Amsterdam (Pays-Bas) et Irvine (Californie, États-Unis). Le test n'a été exécuté qu'une fois par jour : l'échantillon 1 avait 25 mesures, l'échantillon 2, 17 mesures et l'échantillon 3, 14 mesures. La reproductibilité relative médiane de l'indice Blueprint était de 98 % pour le type luminal, de 98 % pour le type HER2 et de 98 % pour le type basal.

La reproductibilité a été évaluée entre deux isollements d'ARN obtenu à partir du même tissu FFIP, pour un total de 43 échantillons. Les deux isollements des 43 échantillons de tissu ont été analysés sur le test Blueprint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) le même jour. La concordance entre le premier isolement et le deuxième isolement en utilisant ces 43 échantillons était de 100 %.

La reproductibilité interlaboratoire a été évaluée au sein de deux sites européens externes et du laboratoire d'Agendia à Amsterdam (Pays-Bas). L'ARN isolé à partir de 16 échantillons FFIP a été expédié aux trois sites pour être testé. Les 16 échantillons ont été répartis entre au moins deux opérateurs sur chaque site. La reproductibilité interlaboratoire a été déterminée entre les deux sites externes et Agendia. La concordance totale était de 100 %.

Performances cliniques

Une étude de corrélation sur site a été menée sur deux sites européens indépendants. Les échantillons cancéreux du sein ont été recueillis de manière prospective auprès de 95 patientes de la population visée par l'utilisation (cancer de niveau I ou II, taille de tumeur inférieure ou égale à 5 cm et ganglions lymphatiques négatifs ou zéro à trois ganglions lymphatiques positifs). Ces échantillons ont été traités sur les sites dans le cadre du test Blueprint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) et une partie du tissu a été expédiée au laboratoire d'Agendia

à Amsterdam (Pays-Bas) afin d'être testée avec le test Blueprint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) et le test FFIP Blueprint actuellement commercialisé, qui repose sur la technologie des microréseaux. Les performances du test ont été évaluées en comparant les résultats NGS du test Blueprint obtenus sur les sites et les résultats FFIP Blueprint et les résultats du test Blueprint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) obtenus au sein d'Agendia. La concordance entre le test Blueprint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) effectué sur les sites et le test Blueprint basé sur le

séquençage de nouvelle génération (NGS) effectué au sein d'Agendia incluant 86 échantillons était de 100 %. De même, la concordance entre le test BluePrint basé sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) effectué sur les sites et le test FFIP BluePrint qui repose sur la technologie des microréseaux effectué au sein d'Agendia était de 98 %.

Assistance

Si vous avez des questions concernant l'utilisation du présent produit, veuillez contacter l'assistance NGS d'Agendia par courrier électronique, à l'adresse NGS.support@agendia.com, ou par téléphone, au +31 (0) 20 462 1510, du lundi au vendredi, de 8 heures 30 à 17 heures (GMT/UTC +1).

Nom et établissement commercial



Agendia NV

Radarweg 60

1043NT Amsterdam

Pays-Bas

Téléphone : +31 (0)20 462 1510

Adresse

électronique :

customerservice@agendia.com



Basic UDI-DI: 085002484193128042

Date de publication :

Février 2025 version 7

Modifications par rapport à la version précédente

Mise à jour de la section d'avertissement et de précautions de la puce 3, supprimée 'en tant que marqueur pronostique uniquement' MKT-339v7

Section Usage prévu complétée, mises à jour MP et BP dans les sections Usage prévu, Avertissements et précautions et Limitations de la procédure, UDI ajouté - MKT-339 v6

Informations complémentaires BP ajoutées – MKT-339 v5

Correction de l'étape 2.37 – MKT-339 v4

Ajout de Windows 10 – MKT-339 v3

Mise à jour du site Web – MKT-339 v2

Version initiale – MKT-339-v1

Avis de sécurité

Signalez tout incident grave en lien avec le kit NGS MammaPrint Blueprint et le logiciel ADAPT au fabricant et à l'autorité compétente de l'état membre. Le fabricant signalera l'incident à l'autorité compétente de l'état membre où l'utilisateur/le patient est basé.



© 2021 Agendia. Tous droits réservés.

Agendia®, MammaPrint® et Blueprint® sont des marques commerciales d'Agendia NV et/ou de ses filiales aux États-Unis. Les autres noms et marques commerciales sont la propriété de leurs détenteurs respectifs.

Les consignes du présent document doivent être strictement observées par du personnel qualifié et dûment formé afin de garantir l'utilisation correcte et sûre du produit décrit ici. LE FAIT DE NE PAS LIRE OU RESPECTER TOUTES LES CONSIGNES CI-INCLUSES PEUT ENTRAÎNER DES DOMMAGES AU NIVEAU DU PRODUIT ET DES BLESSURES (POUR L'UTILISATEUR OU DES TIERS). LA SOCIÉTÉ AGENDIA NE PEUT ÊTRE TENUE RESPONSABLE DES DOMMAGES RÉSULTANT DE L'UTILISATION INCORRECTE DU OU DES PRODUITS DÉCRITS ICI (Y COMPRIS DE PARTIES DU OU DES PRODUITS OU DU LOGICIEL).

Symboles

Reportez-vous au tableau suivant pour des informations complètes au sujet des symboles qui peuvent apparaître sur l'étiquette et l'emballage du produit.

Symbole	Titre du symbole	Description du symbole
	Fabricant	Fabricant du dispositif médical, conformément à la réglementation (UE) 2017/746
	Date limite d'utilisation	Date après laquelle le dispositif médical ne doit plus être utilisé
	Code du lot	Code de lot du fabricant qui permet d'identifier le lot.
	Numéro de catalogue	Numéro de catalogue du fabricant qui permet d'identifier le dispositif médical
	À conserver à l'abri de la lumière du soleil	Le dispositif médical doit être protégé des sources de lumière.
	Limite de température	Limites de température auxquelles le dispositif médical peut être exposé en toute sécurité
	Consultez les consignes d'utilisation	L'utilisateur doit consulter les consignes d'utilisation.
	Attention	L'utilisateur doit consulter les consignes d'utilisation pour obtenir des mises en garde importantes, telles que des avertissements et des consignes qui ne peuvent pas être présentés sur le dispositif médical même pour une multitude de raisons.
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>	Il s'agit d'un dispositif médical conçu pour être utilisé en tant que dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> .
	Le dispositif ne doit pas être utilisé si l'emballage est endommagé	Indique que le dispositif médical ne doit pas être utilisé si l'emballage est endommagé ou a été ouvert.
	Contenu suffisant pour les tests	Indique le nombre total de tests de diagnostic <i>in vitro</i> qui peuvent être effectués avec le dispositif de diagnostic <i>in vitro</i> .
	Port d'une protection oculaire obligatoire	Vous devez porter une protection oculaire.
	Port de gants de protection obligatoire	Vous devez porter des gants de protection.
	Port d'une tenue de protection obligatoire	Vous devez porter une tenue de protection.

	Corrosive	Peut être corrosif pour les métaux. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
	Serious Health Hazard	Peut être mortel en cas d'ingestion et de pénétration dans les voies respiratoires. Risque avéré d'effets graves pour les organes. Risque présumé d'effets graves pour les organes. Peut nuire à la fertilité ou au fœtus. Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus. Peut provoquer le cancer. Susceptible de provoquer le cancer. Peut induire des anomalies génétiques. Susceptible d'induire des anomalies génétiques. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.

Bibliographie

- [1] J. C. Haan, R. Bhaskaran, A. Ellappalaym, Y. Bijl, C. Griffioen, W. Audeh, F. Penault-Llorca, L. Mittempergher and A. Glas, "MammaPrint and Blueprint comprehensively capture the cancer hallmarks in early-stage breast cancer patients," *Genes Chromosomes Cancer*, pp. 148-160, 2021.
- [2] L. J. van 'Veer, H. Dai, M. J. van de Vijver, Y. D. He, A. A. Hart, M. Mao, H. L. Peterse, K. van der Kooy, M. J. Marton, A. T. Witteveen, G. J. Schreiber, R. M. Kerkhoven and C. Robert, "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer," *Nature*, vol. 415, pp. 530 - 535, 2002.
- [3] M. J. van de Vijver, Y. D. He, L. J. van't Veer, D. Hongyue, A. Hart, D. W. Voskuil, G. J. Schreiber, J. L. Peterse, C. Roberts, M. J. Marton, M. Parrish, D. Atsma, A. Witteveen and A. Glas, "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 347, no. 25, pp. 1999 - 2009, 19 December 2002.
- [4] A. M. Glas, A. Floore, L. J. Delahaye, A. T. witteveen, P. R. C.F., N. L.-D. J. S. Bakx, T. J. Bruinsma, M. O. Warmoes, R. Bernards, L. F. Wessels and L. J. van 't Veer, "Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test," *BMC Genomics*, October 2006.
- [5] O. Krijgsman, P. Roepman, W. Zwart, J. S. Carroll, S. Tian, F. A. de Snoo, R. A. Bender, R. Bernards and A. M. Glas, "A diagnostic gene profile for molecular subtyping of breast cancer associated with treatment response," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 133, no. 1, pp. 37-47, 2012.
- [6] S. Mook, M. K. Schmidt, B. Weigelt, B. Kreike, I. Eekhout, M. J. van de Vijver, A. M. Glas, A. Floore, E. J. T. Rutgers and L. J. van 't Veer, "The 70-gene prognosis signature predicts early metastasis in breast cancer patients between 55 and 70 years of age.," *Annals of Oncology*, vol. 21, no. 4, pp. 717-722, 2009.

- [7] M. Buyse, L. Sherene, v. 'l. V. Laura, G. Viale, M. Delorenzi, A. M. Glas, M. Saghastchian d'Assignies, B. Jonas, R. Lideau, P. Ellis, A. Harris, J. Bogaerts, P. Therasse and A. Floore, "Validation and Clinical Utility of a 70-Gene Prognostic Signature for Women with Node-Negative Breast Cancer," *Journal of the Nat. Can. Int.*, vol. 98, no. 17, pp. 1183 - 1192, 6 September 2006.
- [8] C. Drukker, J. Bueno-de-Mesquita, V. Retel, W. van Harten, H. van Tinteren, J. Wesseling, R. Roumen, M. Knauer, L. van 't Veer, G. Sonke, E. Rutgers, M. van de Vijver and S. Linn, "A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study," *International Journal of Cancer*, vol. 133, pp. 929 - 936, January 2013.
- [9] I. Beumer, A. Witteveen, L. Delahaye, D. Wehkamp, M. Snel, C. Dreezen, J. Zheng, A. Floore, G. Brink, B. Chan, S. Linn, R. Bernardis, L. van 't Veer and A. Glas, "Equivalence of MammaPrint array types in clinical trials and diagnostics," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 156, no. 2, pp. 279-287, 2016.
- [10] S. Gluck, F. de Snoo, J. Peeters, L. Stork-Sloots and G. Somlo, "Molecular subtyping of early-stage breast cancer identifies a group of patients who do not benefit from neoadjuvant chemotherapy," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 139, no. 3, pp. 759-767, 2013.
- [11] M. Piccart, L. J. van 't Veer, C. Poncet, J. M. N. Lopes Cardozo, S. Delaloge, J.-Y. Pierga, P. Vuylsteke, E. Brain, S. Vrijaldenhoven, P. A. Neijenhuis, S. Causeret, T. J. Smilde, G. Viale, A. M. Glas, M. Delorenzi, C. Sotiriou, I. T. Rubio, S. Kümmel, G. Zoppoli, A. M. Thompson, E. Matos, K. Zaman, F. Hilbers, D. Fumagalli, P. Ravdin, S. Knox, K. Tryfonidis, A. Peric, B. Meulemans, J. Bogaerts, F. Cardoso and E. J. T. Rutgers, "70-gene signature as an aid for treatment decisions in early breast cancer: updated results of the phase 3 randomised MINDACT trial with an exploratory analysis by age," *Lancet Oncology*, vol. 22, no. 4, pp. 476-488, 2021.
- [12] K. Yao, R. Goldschmidt, M. Turk, J. Wesseling, L. Stork-Sloots, F. de Snoo and M. Cristofanilli, "Molecular subtyping improves diagnostic stratification of patients with primary breast cancer into prognostically defined risk groups," *Breast Cancer Research Treatment*, vol. 154, no. 1, pp. 81-8, 2015.
- [13] L. Esserman, C. Yau, C. K. Thompson, L. J. van 't Veer, A. D. Borowsky, K. A. Hoadley, N. P. Tobin, B. Nordenskjöld, T. Fornander, O. Stål, C. C. Benz and L. S. Lindström, "Use of Molecular Tools to Identify Patients With Indolent Breast Cancers With Ultralow Risk Over 2 Decades," *JAMA Oncology*, no. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.1261, 2017.
- [14] S. Mook, M. K. Schmidt, G. Viale, G. Pruner, I. Eekhout, A. Floore, A. M. Glas, J. Bogaerts, F. Cardoso, M. J. Piccart-Gebhart, E. T. Rutgers, L. J. Van't Veer and T. C. , "The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 116, no. 2, pp. 295-302, 2009.

- [15] L. J. van 't Veer, C. Yau, N. Y. Yu, C. C. Benz, B. Nordenskjöld, T. Fornander, O. Stål, L. J. Esserman and L. S. Lindström, "Tamoxifen therapy benefit for patients with 70-gene signature high and low risk," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 166, no. 2, pp. 593-601, 2017.
- [16] J. M. Bueno-de-Mesquita, W. H. van Harten, V. P. Retel, L. J. van 't Veer, F. Sam van Dam, K. Karsenberg, K. F. Douma, H. van Tinteren, J. L. Peterse, J. Wesseling, T. S. Wu, D. Atsma, E. J. Rutgers, G. Brink, A. N. Floore, A. M. Glas, R. M. Roumen, F. E. Bellot, C. van Krimpen, S. Rodenhuis, M. J. van de Vijver and S. C. Linn, "Use of 70-gene signature to predict prognosis of patients with node-negative breast cancer: a prospective community-based feasibility study (RASTER)," *Lancet Oncology*, vol. 8, no. 12, pp. 1079-1087, 2007.
- [17] B. S. Wittner, D. C. Sgroi, P. D. Ryan, T. J. Bruinsma, A. M. Glas, A. Male, S. Dahiya, K. Habin, R. Bernards, D. A. Haber, L. J. Van't Veer and S. Ramaswamy, "Analysis of the MammaPrint breast cancer assay in a predominantly postmenopausal cohort," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 10, pp. 2988-93, 2008.
- [18] L. J. Delahaye, D. Wehkamp, A. N. Floore, R. Bernards, L. J. van 't Veer and A. M. Glas, "Performance characteristics of the MammaPrint breast cancer diagnostic gene signature," *Personalized Medicine*, vol. 10, no. 8, pp. 801-811, 2013.

Annexe A : séquences nucléotidiques des indices 8 bp NGS MammaPrint Blueprint

Tableau 1 : séquences nucléotidiques d'indices A01 à H04 du kit MammaPrint Blueprint

Indice (coordonnées de la plaque)	Séquence
A01	ATGCCTAA
B01	GAATCTGA
C01	AACGTGAT
D01	CACTTCGA
E01	GCCAAGAC
F01	GACTAGTA
G01	ATTGGCTC

H01	GATGAATC
A02	AGCAGGAA
B02	GAGCTGAA
C02	AAACATCG
D02	GAGTTAGC
E02	CGAACTTA
F02	GATAGACA
G02	AAGGACAC
H02	GACAGTGC
A03	ATCATTCC
B03	GCCACATA
C03	ACCACTGT
D03	CTGGCATA
E03	ACCTCCAA
F03	GCGAGTAA
G03	ACTATGCA
H03	CGGATTGC
A04	AACTCACC
B04	GCTAACGA
C04	CAGATCTG
D04	ATCCTGTA
E04	CTGTAGCC
F04	GCTCGGTA
G04	ACACGACC
H04	AGTCACTA