

Mode d'emploi

CE UK CA IVD

LeukoStrat® CDx *FLT3* Mutation Assay

Destiné à la détection des mutations de type duplications internes en tandem (ITD) et des mutations du domaine tyrosine kinase (TKD) dans le gène *FLT3* (FMS-like tyrosine kinase 3).

IVD Destiné au diagnostic *in vitro*.



Réf. catalogue

Produits

Quantité

REF

K4120291

LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay

33 réactions

Table des matières

1.	DENOMINATION COMMERCIALE DU PRODUIT.....	4
2.	UTILISATION PREVUE	4
3.	GLOSSAIRE.....	4
4.	RESUME ET EXPLICATION DU TEST.....	4
5.	PRINCIPES DE LA PROCEDURE	5
5.1.	Duplications internes en tandem (ITD) de <i>FLT3</i>	5
5.2.	Mutations du domaine tyrosine kinase (TKD) de <i>FLT3</i>	6
6.	REACTIFS ET MATERIEL	7
7.	INSTRUMENTS/ACCESSOIRES.....	10
7.1.	Logiciel (fourni).....	10
8.	AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS	11
8.1.	Précautions relatives à la cybersécurité.....	11
9.	PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	12
9.1.	Précautions	12
9.2.	Substances qui interfèrent avec la PCR.....	12
9.3.	Conditions de prélèvement et manipulation.....	12
10.	PROCEDURE DE TEST	12
10.1.	Inspection des échantillons	12
10.2.	Préparation en vue du traitement des échantillons.....	12
10.3.	Dilution des échantillons cliniques.....	12
10.4.	Isolement des cellules mononucléées.....	13
10.5.	Numération des cellules mononucléées.....	13
10.6.	Préparation des échantillons pour l'extraction et l'isolement de l'ADN	13
10.7.	Préparation de la station automatisée QIAcube.....	14
10.8.	Extraction de l'ADN.....	14
10.9.	Quantification et dilution de l'ADN	15
10.10.	Amplification.....	16
10.11.	Digestion par enzyme de restriction (mutation TKD uniquement)	17
10.12.	Détection par électrophorèse capillaire	18
10.13.	Préparation de la solution de marqueur de taille (si nécessaire)	18
10.14.	Préparation de la plaque des échantillons	19
10.15.	Configuration de PlateMapper avec le logiciel LeukoStrat CDx <i>FLT3</i>	19
10.16.	Configuration du logiciel de l'analyseur 3500xL.....	27
10.17.	Lancement de l'analyseur génétique 3500xL.....	29
10.18.	Analyse des données avec le logiciel GeneMapper.....	29
10.19.	Analyse des données avec le logiciel LeukoStrat CDx <i>FLT3</i>	31
11.	CONTROLE QUALITE.....	36
11.1.	Validité du programme.....	36
11.2.	Validité du contrôle d'extraction et des échantillons.....	36
12.	INTERPRETATION DES RESULTATS.....	37
13.	REPETITION DES TESTS.....	38
13.1.	Programmes non valides.....	38
13.2.	Contrôle d'extraction non valide au sein de programmes valides.....	38
13.3.	Échantillons non valides au sein de programmes valides	38
13.4.	Codes d'échec et répétition des tests	38
13.5.	Plusieurs échecs au sein d'un programme	43
13.6.	Déplacement du fluorophore	44
14.	LIMITES DE LA PROCEDURE	45

15.	VALEURS ATTENDUES	46
15.1.	Taille attendue des produits amplifiés.....	46
16.	ÉVALUATION DE LA PERFORMANCE NON CLINIQUE	46
16.1.	Tous les groupes évaluables.....	46
16.2.	Sensibilité analytique : limite du blanc (LoB)	48
16.3.	Sensibilité analytique.....	48
16.4.	Précision.....	50
16.5.	Reproductibilité inter-opérateurs (lignées cellulaires)	50
16.6.	Reproductibilité inter-opérateurs (échantillons cliniques).....	50
16.7.	Reproductibilité inter-lots et inter-instruments	51
16.8.	Substances interférentes - Substances exogènes	51
16.9.	Substances interférentes - Substances endogènes	51
16.10.	Substances interférentes - Médicaments	51
16.11.	Contamination par transfert et contamination croisée.....	51
16.12.	Quantité d'ADN de départ.....	52
17.	ÉVALUATION DE LA PERFORMANCE CLINIQUE	52
17.1.	Présentation de l'étude de pont (« bridging study ») pivot (IVS-002-001).....	52
17.2.	Objectifs de l'étude (IVS-002-001).....	52
17.3.	Population de patients (IVS-002-001)	53
17.4.	Sélection des patients et aliquots pour la réalisation du test <i>FLT3</i> CDx (IVS-002-001)	53
17.5.	Analyse de la sécurité (IVS-002-001)	53
17.6.	Efficacité (IVS-002-001)	53
17.7.	Efficacité dans la population (CTA+, CDx+) (489 sujets) : (IVS-002-001)	55
17.8.	Conclusions (IVS-002-001)	56
17.9.	Présentation de l'étude (IVS-056-001)	56
17.10.	Objectifs de l'étude (IVS-056-001).....	56
17.11.	Population de patients (IVS-056-001)	56
17.12.	Sélection des échantillons pour le test par la méthode de référence (IVS-056-001).....	56
17.13.	Analyse de la sécurité (IVS-056-001)	56
17.14.	Efficacité (IVS-056-001)	56
17.15.	Conclusions (IVS-056-001)	58
18.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58
19.	SUPPORT TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT	58
20.	SYMBOLES.....	58
21.	INFORMATIONS LEGALES	59

1. Dénomination commerciale du produit

LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay

2. Utilisation prévue

Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay est un test de diagnostic *in vitro* basé sur la PCR conçu pour détecter les duplications internes en tandem (ITD) et les mutations du domaine tyrosine kinase (TKD) D835 et I836 dans le gène *FLT3* dans l'ADN génomique extrait de cellules mononucléées obtenues à partir du sang périphérique ou d'aspirations de moelle osseuse provenant de patients chez lesquels une leucémie aiguë myéloïde (LAM) a été diagnostiquée.

Dans les pays où la midostaurine est disponible, le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay est utilisé pour faciliter l'évaluation des patients atteints d'une LAM pour lesquels un traitement par RYDAPT® (midostaurine) est envisagé.

Dans les pays où le fumarate de gilteritinib est disponible, le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay est utilisé pour faciliter l'évaluation des patients atteints d'une LAM pour lesquels un traitement par XOSPATA® (fumarate de gilteritinib) est envisagé.

3. Glossaire

Logiciel LeukoStrat CDx <i>FLT3</i>	Logiciel d'analyse de données du test de mutation LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Mutation Assay.
Duplication interne en tandem (ITD)	Duplication et insertion d'une partie du gène <i>FLT3</i> comprenant la région se trouvant à l'intérieur et de part et d'autre de la région juxtamembranaire du gène <i>FLT3</i> .
EC (Extraction Control)	Contrôle d'extraction
NTC (No Template Control)	Contrôle sans matrice (contrôle négatif)
PC (Positive Control)	Contrôle positif
Rapport des signaux	Calculé en divisant l'aire du pic muté par l'aire du pic du type sauvage.
Mutation du domaine tyrosine kinase (TKD)	Changement(s) d'un(de) nucléotide(s) entraînant des modifications du codon 835 et/ou du codon 836 qui sont détectées par l'inactivation du site de restriction de l'enzyme EcoRV au sein du domaine tyrosine kinase du gène <i>FLT3</i> .

4. Résumé et explication du test

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) ont, en général, un pronostic défavorable. L'évaluation du statut mutationnel du gène du récepteur *FLT3* (FMS-like tyrosine kinase 3) dans les LAM à caryotype normal est l'indicateur pronostique le plus important de l'issue de la maladie. Il est souvent crucial. En effet, de nombreuses études portant sur les LAM ont montré que la présence de mutations activatrices de *FLT3* laisse présager un pronostic défavorable.^{1,2} Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay cible des régions du gène *FLT3* afin d'identifier des duplications internes en tandem (ITD) et des mutations du domaine tyrosine kinase (TKD), comme par exemple les mutations D835 et I836, et il a été validé dans le cadre d'un essai clinique international.

Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay comprend les réactifs, le matériel, le logiciel ainsi que les procédures nécessaires pour isoler les cellules mononucléées et extraire l'ADN des échantillons de patients afin de déterminer si des mutations du gène *FLT3* sont présentes. L'ADN est amplifié par PCR, l'amplicon TKD est digéré enzymatiquement, les amplicons sont détectés par électrophorèse capillaire et le statut mutationnel du gène *FLT3* est déterminé par le logiciel LeukoStrat CDx *FLT3*. Une mutation du gène *FLT3* de type ITD et/ou TKD est rapportée comme positive si le rapport des signaux muté/sauvage atteint ou dépasse le seuil de 0,05 (voir section 12 : *Interprétation et résultats*). Une représentation du flux de travail est présentée à la Figure 1.

5. Principes de la procédure

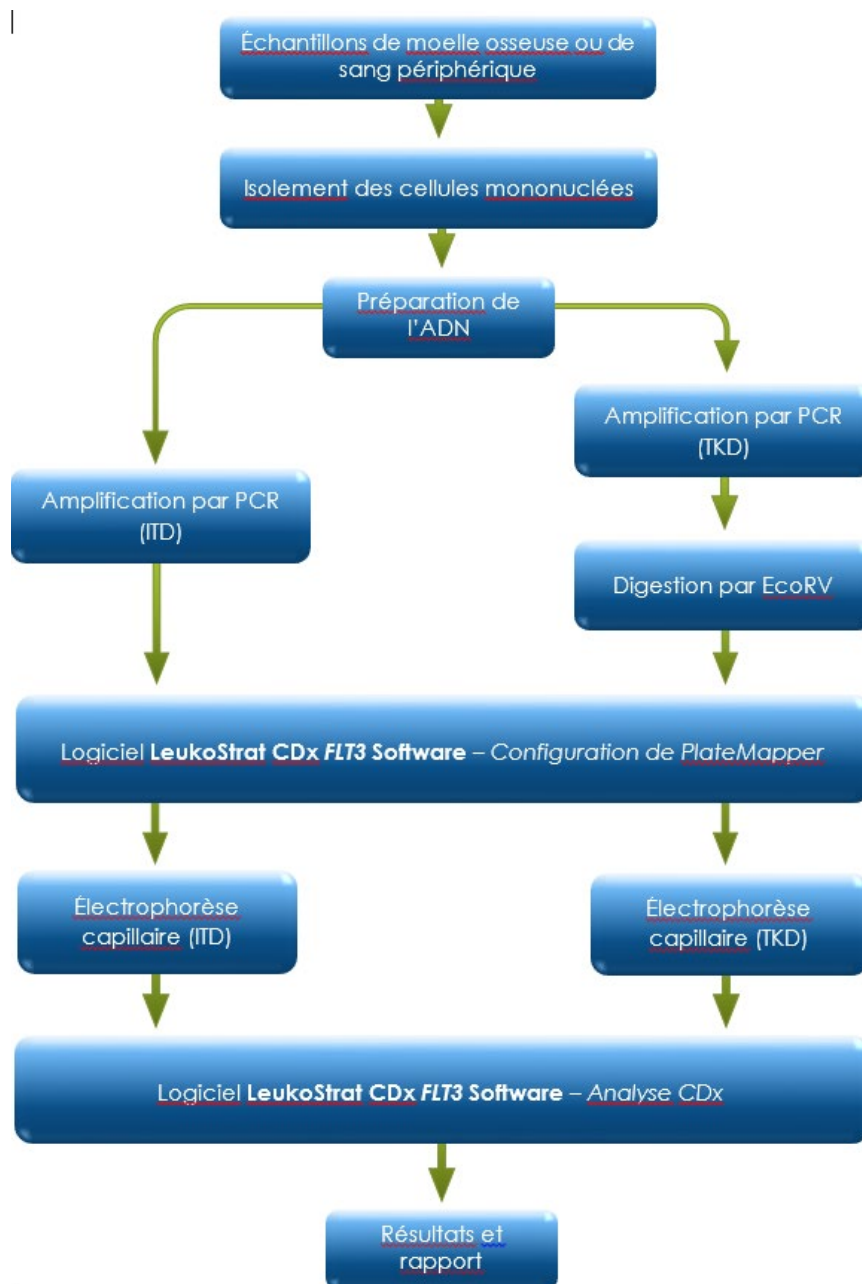


Figure 1 : Résumé du flux de travail

5.1. Duplications internes en tandem (ITD) de *FLT3*

Les mutations *FLT3*-ITD, ou mutations de la longueur, sont dues à la duplication et à l'insertion d'une partie du gène *FLT3* comprenant la région se trouvant à l'intérieur et de part et d'autre de la région juxtamembranaire du gène *FLT3*. Ces mutations varient à la fois selon le lieu d'insertion et selon la longueur de la séquence d'ADN dupliquée insérée. Les mutations ITD entraînent une autophosphorylation et une activation constitutives de *FLT3*.¹

Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay utilise des amorces qui se trouvent à l'intérieur et de part et d'autre de la région juxtamembranaire. Les amorces de PCR sens et antisens sont marquées par fluorescence à l'aide de différents fluorophores qui servent à confirmer la présence d'un signal dans l'échantillon. Les allèles sauvages du gène *FLT3* seront amplifiés et généreront un produit, comme mesuré par ce test, de 327 ± 1 pb, alors que les allèles qui présentent des mutations ITD généreront un produit de plus de 327 ± 1 pb (Figure 2).

5.2. Mutations du domaine tyrosine kinase (TKD) de *FLT3*

Les mutations *FLT3*-TDK sont dues à des substitutions et/ou à des délétions de nucléotides qui entraînent une altération de la séquence d'acides aminés dans ce site actif hautement conservé. Les mutations TKD, comme par exemple les substitutions et délétions D835 et I836, entraînent une autophosphorylation et une activation constitutives de *FLT3*.²

Les allèles sauvages du gène *FLT3* possèdent un site de restriction pour l'endonuclease *EcoRV*. Si une substitution de nucléotides se produit, le site de restriction disparaît et l'endonuclease *EcoRV* est alors incapable d'identifier et de digérer l'ADN au niveau de ce site. Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay utilise des amorces qui se trouvent de part et d'autre de la région TKD. La région cible du gène *FLT3* est amplifiée par PCR, puis une digestion par l'enzyme de restriction *EcoRV* est effectuée. Une des amorces de PCR est marquée avec un fluorophore, l'autre amorce contient un site de restriction *EcoRV* créé par génie génétique. Ainsi, les deux types d'allèles, sauvage et muté, sont digérés. Le schéma de la digestion permet d'identifier la perte de la séquence normale du gène et de s'assurer que la digestion a eu lieu. Les allèles sauvages du gène *FLT3* génèrent des produits de digestion de 79±1 pb alors que les allèles mutés génèrent des produits de digestion de 125±1 pb ou de 127±1 pb à partir de l'amplicon d'origine non digéré de 145±1 pb ou de 147±1 pb, comme mesuré par ce test (Figure 2).

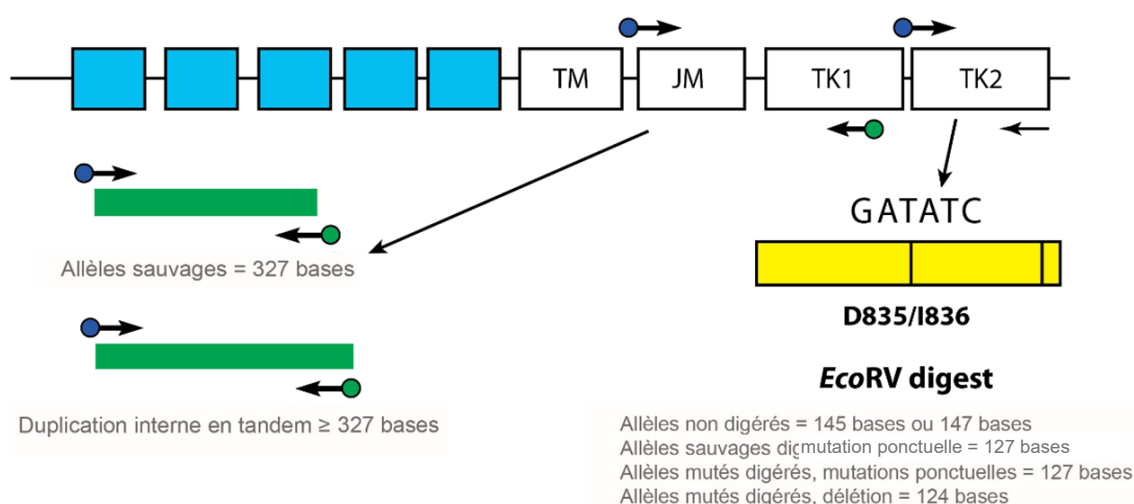








Figure 2 : Illustration de la région juxtamembranaire (JM) du gène *FLT3* (TM = transmembranaire) et de la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase (TK). Les flèches noires représentent les positions relatives des amorces qui ciblent la région se trouvant à l'intérieur et de part et d'autre de la région juxtamembranaire pour les mutations ITD ou qui ciblent la boucle d'activation du domaine kinase pour les mutations TKD. Les points colorés représentent les fluorophores sur les amorces marquées. Le rectangle jaune possède deux lignes noires verticales qui représentent la position des sites de restriction de l'enzyme *EcoRV*.

6. Réactifs et matériel

REMARQUE : Le kit du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur le kit lorsqu'il est conservé dans les conditions décrites dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Liste des réactifs du kit du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, **REF** K4120291

Référence catalogue	Nom du réactif	Température de conservation	Quantité unitaire	Nbre d'unités par kit
REF R0880080**	<i>FLT3</i> Extraction Control		1 800 µL/flacon	1 flacon
REF B4120051*	<i>FLT3</i> ITD Master Mix		1 500 µL/flacon	1 flacon
REF B4120061*	<i>FLT3</i> TKD Master Mix		1 500 µL/flacon	1 flacon
REF R0880060**	<i>FLT3</i> ITD Positive Control		100 µL/flacon	1 flacon
REF R0880070**	<i>FLT3</i> TKD Positive Control		100 µL/flacon	1 flacon
REF R0930020**	<i>FLT3</i> No Template Control		200 µL/flacon	1 flacon

*Les flacons des mélanges réactionnels (« master mixes ») ouverts conservés congelés peuvent subir jusqu'à 4 cycles de congélation/décongélation.

**Les flacons de contrôles ouverts conservés congelés peuvent subir jusqu'à 8 cycles de congélation/décongélation.

Tableau 2 : Réactifs, matériel et équipement supplémentaires nécessaires (non fournis), références catalogue pour l'Union européenne

Réactif/Matériel	Réactifs/Matériel recommandés et fournisseurs	Référence catalogue*	Remarques
ADN polymérase	Roche : • EagleTaq DNA Polymerase	05206944190	S.O.
Pipettes calibrées	Sartorius : • eLINE® monocanal 5 à 120 µL • eLINE® 8 canaux 0,2 à 10 µL, ou équivalent Gilson : • Pipettes P2M, P10N, P20N, P100N, P200N et P1000N, ou équivalent	S.O.	Précision requise pour mesurer des volumes allant de 0,5 µL à 1 000 µL
Thermocycleur	Thermo Fisher Scientific : • Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler	4452300	S.O.
Réactifs endonucléase EcoRV	New England Biolabs : • EcoRV 20 000 unités/mL	R0195S ou R0195L	NEBuffer™ r3.1 est fourni à l'achat d'EcoRV
Agitateur vortex	S.O.	S.O.	S.O.
Plaques ou tubes pour PCR	S.O.	S.O.	Plaques stériles, à jupe
Pointes de pipettes à filtre barrière	S.O.	S.O.	Stériles, exemptes de RNase/DNase/apyrogyènes
Microcentrifugeuse	S.O.	S.O.	S.O.
Appareil d'électrophorèse capillaire et logiciel de Thermo Fisher Scientific	Thermo Fisher Scientific : • Analyseur génétique série 3500xL	4440467	Cet appareil ne porte pas le marquage CE.
	Logiciel GeneMapper® v4.1.x	4366925	
Formamide hautement déionisé	Thermo Fisher Scientific : • Hi-Di™ Formamide	4401457	S.O.
Marqueurs de taille LIZ	Thermo Fisher Scientific : • GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0	4408399	S.O.

Tableau 2 : Réactifs, matériel et équipement supplémentaires nécessaires (non fournis), références catalogue pour l'Union européenne

Réactif/Matériel	Réactifs/Matériel recommandés et fournisseurs	Référence catalogue*	Remarques
Jeu de fluorophores pour calibration spectrale G5	Thermo Fisher Scientific : • DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)	4345833	Jeu de fluorophores utilisé pour la calibration spectrale de l'instrument 3500xL
Polymère	Thermo Fisher Scientific : • POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers	4393708	S.O.
Tampon	Thermo Fisher Scientific : • Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series	4393927	S.O.
	Thermo Fisher Scientific : • Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series	4408256	S.O.
Réseau de capillaires	Thermo Fisher Scientific : • 3500xL Genetic Analyzer 24-Capillary Array 50 cm	4404689	S.O.
Septums	Thermo Fisher Scientific : • Septa Cathode Buffer Container (pour les analyseurs génétiques de la série 3500)	4410715	S.O.
	Thermo Fisher Scientific : • Septa for 3500/3500xL Genetic Analyzers, 96 puits	4412614	S.O.
Ensemble support et socle pour l'analyseur 3500xL de Thermo Fisher Scientific	Thermo Fisher Scientific : • 3500 Series 96 Well Standard Retainer & Base Set	4410228	S.O.
Film d'aluminium pour plaque 96 puits	S.O.	S.O.	S.O.
Barrettes de 8 bouchons pour plaque 96 puits	S.O.	S.O.	S.O.
Eau distillée déionisée de qualité biologie moléculaire ou eau de qualité USP (Pharmacopée américaine)	S.O.	S.O.	Sterile, exempte de RNase/DNase
Extraction de l'ADN	Qiagen : • QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit	61104	Inclut le tampon de lyse (AL), les tampons de lavage (AW1 et AW2), le tampon d'élution (AE), le solvant de protéase, la protéase, les tubes d'élution, les tubes de lyse et les colonnes de centrifugation
Isolement des cellules mononucléées	Milieu à gradient de densité	S.O.	Densité : 1,077 g/mL
Solution saline tamponnée	Mediatech Inc. (Corning) : • Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	21-031-CV	S.O.
Milieu de culture	Mediatech Inc. (Corning) : • RPMI 1640 with L-glutamine	10-040-CV	S.O.
Compteur de cellules	S.O.	S.O.	S.O.
Spectrophotomètre UV à microvolume	S.O.	S.O.	Capable de mesurer l'absorbance à 260 nm pour le calcul de la concentration en acides nucléiques

Tableau 2 : Réactifs, matériel et équipement supplémentaires nécessaires (non fournis), références catalogue pour l'Union européenne

Réactif/Matériel	Réactifs/Matériel recommandés et fournisseurs	Référence catalogue*	Remarques
Alcool éthylique/Éthanol	S.O.	S.O.	Absolu anhydre et de qualité ACS/USP (Société américaine de chimie/Pharmacopée américaine)
Extracteur d'ADN	QIAgen : • Système QIAcube (110 V)	9001882	S.O.
Flacons de réactif pour l'extracteur d'ADN	QIAgen : • Reagent Bottles, 30 mL (6)	990393	S.O.
Portoir des flacons de réactif pour l'extracteur d'ADN	QIAgen : • Reagent Bottle Rack	990390	S.O.
Adaptateur pour le rotor de l'extracteur d'ADN et son support	QIAgen : • Rotor Adapters (10 x 24) • Rotor Adapter Holder	990394 990392	S.O.
Plaques pour l'électrophorèse capillaire, à jupe	Life Technologies : • MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	4316813	S.O.

*Les références catalogue indiquées dans le Tableau 2 sont spécifiques à l'Union européenne. Contacter au besoin le fournisseur indiqué pour obtenir les références catalogue équivalentes dans votre pays.

Tableau 3 : Matériel général de laboratoire (non fourni)

Description du matériel
Tubes coniques de 15 mL
Tubes coniques de 50 mL
Pipettes sérologiques de 5, 10 et 25 mL
Lingettes non pelucheuses
Minuteur étalonné
Désinfectant pour le QIAcube, comme par exemple le produit Coverage Spray TB de Steris
Glace et seau à glace
Récipient pour déchets liquides
Tubes de volume approprié et aux parois non adhérentes pour la dilution de l'ADN et les aliquots
Tubes de volume approprié pour les solutions DPBS, PCR et de mélange réactionnel pour la digestion
Tubes à échantillons destinés au QIAcube
Bouchons à visser pour les tubes à échantillons destinés au QIAcube
Pipettes de transfert jetables
Pointes de pipettes

7. Instruments/Accessoires

REMARQUE : Tout l'équipement doit être correctement entretenu selon les instructions du fabricant.

- Réfrigérateur permettant une conservation entre 2°C et 8°C
- Congélateur permettant une conservation entre -30°C et -15°C
- Hotte
- Pipeteur
- Pipettes à répétition
- Pipettes multicanaux, manuelles et électroniques
- Centrifugeuse capable de centrifuger à 1 000 g, à rotor libre et munie d'un système de réfrigération
- Centrifugeuse capable de centrifuger à 1 400 g, à rotor libre
- Les instruments et accessoires mentionnés ci-dessus ne sont pas fournis

7.1. Logiciel (fourni)

7.1.1. **REF** : K4120281 – Logiciel LeukoStrat CDx *FLT3* v1.1.x.IVD

L'application logicielle LeukoStrat a été validée pour une résolution 1920 x 1200, avec le paramètre d'affichage « Smaller – 100 % (Plus petit - 100 %) ». Les autres résolutions peuvent poser problème.

7.1.1.1. Configuration requise :

- Système d'exploitation : Windows™ 10
- Processeur : Intel Core 2 Duo ou processeur plus récent recommandé
- Mémoire RAM : 4 Go minimum
- Espace disque disponible : 5 Go minimum
- Un lecteur de CD-ROM
- Adobe Acrobat Reader 2018, 2019, 2020, ou 2021

7.1.2. Si votre établissement utilise le jeu de caractères Latin-1, ne tenez pas compte de la section 7.1.2. S'il utilise un autre jeu de caractères, lisez les instructions ci-dessous avant d'installer le logiciel pour diagnostic in vitro LeukoStrat CDx *FLT3* v1.1.2.IVD.

7.1.2.1. S'il utilise un autre jeu de caractères que Latin-1, il est recommandé d'installer le logiciel LeukoStrat CDx *FLT3* v1.1.2.IVD sur une station de travail distincte.

7.1.2.2. Le logiciel LeukoStrat CDx *FLT3* v1.1.2.IVD peut fonctionner uniquement si les paramètres régionaux du système d'exploitation Microsoft Windows 10 sont réglés sur Anglais (États-Unis) ou tout autre paramètre régional utilisant le jeu de caractères Latin-1.

7.1.2.3. Pour modifier les paramètres régionaux :

7.1.2.3.1 Ouvrir le menu Démarrer et saisir Panneau de configuration. Cliquer sur Panneau de configuration pour l'ouvrir.

7.1.2.3.2 Sélectionner **Région** ou **Horloge et Région > Région**, puis cliquer sur l'onglet Administration.

7.1.2.3.3 Cliquer sur l'icône **Modifier le paramètre régional du système** et remplacer la langue sélectionnée par Anglais (États-Unis).

7.1.2.3.3.1 S'il existe une option bêta pour une prise en charge des langues du monde entier, ne pas cocher la case.

7.1.2.4. Il est à noter que la modification des paramètres régionaux peut entraîner le dysfonctionnement d'un autre logiciel installé sur la même station de travail que le logiciel pour diagnostic in vitro LeukoStrat CDx *FLT3* v1.1.2.IVD. Si tel est le cas, sélectionner les paramètres régionaux initiaux lors de l'utilisation de ce logiciel.

8. Avertissements et précautions



Veillez lire attentivement le présent mode d'emploi avant de débiter la procédure de test et suivre rigoureusement chaque étape.

- **IVD** Ce produit est destiné au **diagnostic *in vitro***.
- Une dilution, une réduction des volumes des réactions d'amplification ou tout autre écart par rapport à ce protocole peut affecter la performance de ce test et/ou annuler toute sous-licence limitée accordée avec l'achat de ce kit. Ne pas mélanger ou combiner les réactifs de kits comportant des numéros de lots différents.
- Les produits sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.
- Éliminer les réactifs non utilisés et les déchets conformément aux règlements en vigueur dans votre pays.
- Noter le nombre de cycles de congélation/décongélation.
- Effectuer toutes les procédures de laboratoire en portant un équipement de protection individuelle standard (gants, blouse et lunettes de protection). Suivre les bonnes pratiques de laboratoire et les précautions universelles lors de la manipulation des échantillons. Ne pas pipeter à la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer dans le laboratoire. Se laver soigneusement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs de test. Manipuler les échantillons dans des installations de confinement de sécurité biologique approuvées et ouvrir les récipients uniquement dans une enceinte de sécurité biologique certifiée.
- En raison de la sensibilité analytique de ce test, prendre de très grandes précautions pour éviter de contaminer les réactifs ou les mélanges d'amplification avec des échantillons, des contrôles ou des produits amplifiés. Utiliser de nouvelles pointes de pipettes à filtre entre chaque échantillon et entre chaque transfert de réactifs. Contrôler attentivement tous les réactifs pour détecter tout signe de contamination (p. ex. contrôles négatifs donnant des signaux positifs). Jeter les réactifs suspectés d'être contaminés.
- Afin de minimiser les contaminations, porter des gants propres lors de la manipulation des échantillons et des réactifs et nettoyer systématiquement les plans de travail et les pipettes avant de réaliser une PCR.
- L'autoclavage ne permet pas d'éliminer l'ADN issu d'une contamination. La progression du travail dans un laboratoire de PCR doit se faire dans un seul sens entre des zones de travail séparées ; commencer par la préparation des échantillons, puis réaliser l'amplification et enfin la détection. N'introduire aucun ADN amplifié dans les zones réservées à la préparation des échantillons.
- Réserver toutes les pipettes et les pointes de pipettes, ainsi que tout le matériel utilisé dans une zone particulière à cette zone du laboratoire.
- Utiliser des consommables en plastique stériles et jetables dans la mesure du possible pour éviter toute contamination par des RNases, DNases ou une contamination croisée.
- Les instruments et le matériel doivent être correctement entretenus et calibrés selon les recommandations des fabricants.
- Une fois le sachet équilibré à température ambiante, examiner l'intérieur du col de chaque sachet de polymère POP-7 au point d'installation. Vérifier que la fixation du sachet ne présente pas de polymère sec ou cristallisé. Ne pas installer le sachet sur l'instrument 3500 si des cristaux sont présents, car ceux-ci pourraient avoir un impact sur les performances du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay et de l'instrument 3500. Contacter le support client de Thermo Fisher.

8.1. Précautions relatives à la cybersécurité

- Les ordinateurs et les réseaux peuvent être sujets à des risques de sécurité s'ils ne sont pas sécurisés et mis à jour activement. Un ordinateur et un réseau correctement sécurisés permettent de garantir que les données ne sont pas compromises, perdues ou endommagées en raison de risques de cybersécurité évitables. Équiper tous les ordinateurs d'un logiciel antivirus actif et à jour.
- Filtrer et sécuriser le trafic réseau à l'aide d'un pare-feu.
- Conserver les données sur des ordinateurs locaux pour limiter les risques de cybersécurité potentiels liés au transfert de données sensibles sur un réseau.
- Installer le logiciel uniquement pour un utilisateur local afin d'éviter toute utilisation non autorisée du logiciel.
- Veiller à ce que Windows et Adobe Acrobat Reader soient toujours à jour, avec les derniers correctifs de sécurité installés.
- Veiller à ce que le logiciel de lecture des fichiers au format PDF par défaut sous Windows soit Adobe Acrobat Reader. La consultation des rapports sur les échantillons et sur les analyses dans un navigateur Internet peut entraîner des risques de cybersécurité pour les données des patients.
- Le logiciel LeukoStrat CDx *FLT3* a été validé avec les logiciels antivirus suivants:
 - Symantec Endpoint Protection Version 14.3
 - McAfee Endpoint Security Version 10.7
 - ESET Endpoint Security Version 9.0

9. Prélèvement et préparation des échantillons

9.1. Précautions

Les échantillons biologiques humains peuvent contenir des substances potentiellement infectieuses. Manipuler tous les échantillons conformément au programme de contrôle des pathogènes transmissibles par le sang de votre établissement et/ou au niveau de sécurité biologique 2.

9.2. Substances qui interfèrent avec la PCR

- Chélateurs des cations divalents
- Pointes de pipettes à faible rétention
- EDTA (non significatif à faible concentration)

9.3. Conditions de prélèvement et manipulation

- Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay requiert au moins 1 mL de sang périphérique ou 0,25 mL de moelle osseuse anticoagulé avec de l'héparine sodique ou de l'EDTA.
- Les échantillons peuvent être conservés entre 2°C et 8°C pendant un maximum de 7 jours avant d'être testés.
- L'intégrité et le contenu des tubes d'échantillons ne doivent pas être compromis (c.-à-d. qu'ils ne doivent pas être congelés pendant le transport).

10. Procédure de test

10.1. Inspection des échantillons

- 10.1.1. Déballer les échantillons de sang périphérique et/ou d'aspirations de moelle osseuse et rejeter les échantillons qui ne répondent pas aux conditions présentées à la section 9.3.

10.2. Préparation en vue du traitement des échantillons

- 10.2.1. Procéder au traitement des échantillons dans une zone de travail réservée à cet effet.
- 10.2.2. Transférer environ 12 mL de milieu RPMI-1640 par échantillon dans des tubes coniques étiquetés de 50 mL. Laisser le milieu s'équilibrer à température ambiante pendant au moins 1 heure 45 minutes.
 - 10.2.2.1. Si le milieu RPMI-1640 froid est aliquoté dans des tubes coniques de 15 mL, le laisser s'équilibrer à température ambiante pendant au moins 45 minutes.
- 10.2.3. Pour chaque échantillon, aliquoter 3 mL de milieu à gradient de densité dans un tube conique étiqueté de 15 mL.
 - 10.2.3.1. Si le milieu à gradient de densité a été conservé entre 2°C et 8°C, laisser les aliquots de milieu à gradient de densité s'équilibrer à température ambiante pendant 1 heure avant de les utiliser.
- 10.2.4. Transférer environ 200 µL de DPBS par échantillon dans un tube étiqueté de volume approprié et le laisser s'équilibrer à température ambiante pendant au moins 45 minutes avant de l'utiliser.

10.3. Dilution des échantillons cliniques

REMARQUE : Les instructions d'utilisation du robot QIAcube pour l'extraction de l'ADN sont incluses dans ce manuel. L'utilisation d'un robot QIAcube est recommandée, mais n'est pas obligatoire. Si un QIAcube est utilisé, s'assurer qu'un espace est réservé au contrôle d'extraction.

- 10.3.1. Mélanger les tubes d'échantillons en les retournant 4 à 6 fois. Ajouter des aliquots d'échantillons (1 à 3 mL de sang périphérique ou 0,25 à 0,75 mL de moelle osseuse) dans des tubes coniques de 15 mL étiquetés individuellement.
- 10.3.2. Ajouter du milieu RPMI-1640 à chaque aliquot d'échantillon pour obtenir un volume total de 6 mL. Bien boucher les tubes et mélanger doucement en retournant 3 à 5 fois les tubes ou aspirer et refouler plusieurs fois avec une pipette jusqu'à ce que le mélange soit d'une consistance uniforme.
- 10.3.3. Le reste des échantillons peut être conservé entre 2°C et 8°C.

10.4. Isolement des cellules mononucléées

- 10.4.1. À l'aide d'une pipette de transfert, déposer délicatement l'échantillon dilué de sang périphérique ou de moelle osseuse à la surface du milieu à gradient de densité. Incliner le tube contenant le milieu à gradient de densité tout en déposant très lentement l'échantillon à sa surface à l'aide de la pipette afin d'éviter de mélanger les couches.
- 10.4.2. Une fois le pipetage de l'échantillon terminé, remettre doucement le tube en position verticale et bien le boucher.
- 10.4.3. Centrifuger les tubes coniques de 15 mL dans les conditions suivantes, en s'assurant que le frein est complètement désengagé :
 - Force = 400 g (rcf)
 - Durée = 30 minutes
 - Température = 20°C
 - Accélération/Décélération = minimum
- 10.4.4. Pour chaque échantillon à traiter, aliquoter 6 mL de milieu RPMI-1640 dans un nouveau tube conique étiqueté de 15 mL.
- 10.4.5. Après la centrifugation, utiliser une pipette de transfert pour aspirer lentement la couche de cellules mononucléées ou jusqu'à ce qu'un maximum de 3 mL ait été retiré.
- 10.4.6. Transférer la couche de cellules mononucléées en suspension collectée dans le tube conique de 15 mL portant l'étiquette correspondante et contenant 6 mL de milieu RPMI-1640. Boucher le tube et mélanger doucement en le retournant 3 à 5 fois.
- 10.4.7. Centrifuger les tubes coniques dans les conditions suivantes :
 - Force = 355 à 364 g (rcf)
 - Durée = 10 minutes
 - Température = 20°C
 - Accélération/Décélération = maximum
- 10.4.8. Éliminer le surnageant du culot cellulaire en retournant le tube une seule fois avant de le remettre en position verticale. Remettre le culot en suspension dans le liquide restant en tapotant le tube 10 à 15 fois ou jusqu'à ce que le culot soit remis en suspension.
- 10.4.9. Ajouter 1 mL de milieu RPMI-1640 au culot remis en suspension. Boucher le tube et mélanger doucement en le tapotant 6 à 8 fois.
- 10.4.10. Placer les tubes d'échantillons dans un bain d'eau glacée jusqu'à ce que la numération des cellules mononucléées soit terminée.

10.5. Numération des cellules mononucléées

Obtenir une numération des cellules mononucléées à l'aide d'un système de comptage cellulaire approprié. Réduire au maximum le volume utilisé pour la numération cellulaire afin de s'assurer qu'il reste une quantité adéquate d'ADN pour effectuer le test.

10.6. Préparation des échantillons pour l'extraction et l'isolement de l'ADN

- 10.6.1. Si la concentration rapportée est ≤ 5 millions de cellules/mL, tout le volume de la suspension cellulaire est traité. Passer à l'étape 10.6.3.
- 10.6.2. Si la concentration rapportée est > 5 millions de cellules/mL, calculer le volume d'échantillon contenant 5 millions de cellules vivantes (V_i) car les colonnes de centrifugation du QIAcube ne sont adaptées que pour ≤ 5 millions de cellules.
 - 10.6.2.1. Utiliser l'équation $C_i V_i = C_f V_f$ pour calculer le volume V_i de chacun de ces échantillons.
 - C_i = concentration cellulaire (cellules/mL) obtenue à partir de la numération des cellules mononucléées
 - C_f = concentration finale (5 millions de cellules/mL)
 - V_f = volume final (1 mL)
 - $V_i = \frac{5\,000\,000 \frac{\text{cellules}}{\text{mL}} \times 1\,\text{mL}}{C_i}$
 - 10.6.2.2. Utiliser l'équation $V_f - V_i$ pour calculer le volume de milieu RPMI-1640 à ajouter au volume V_i afin d'amener le volume à 1 000 μL .
 - 10.6.2.3. Mélanger doucement les tubes contenant > 5 millions de cellules/mL en tapotant les tubes 6 à 8 fois.
 - 10.6.2.4. Pour chacun des échantillons, transférer les volumes calculés dans un tube conique étiqueté de 15 mL.

- 10.6.3. Centrifuger les tubes coniques de 15 mL contenant les suspensions cellulaires dans les conditions suivantes :
- Force = 355 à 364 g (rcf)
 - Durée = 10 minutes
 - Température = 20°C
 - Accélération/Décélération = maximum
- 10.6.4. À l'aide d'une pipette de transfert, aspirer le surnageant des culots cellulaires. Un petit volume de milieu peut rester.
- 10.6.5. Tapoter les tubes coniques de 15 mL 10 à 15 fois ou jusqu'à ce que les culots se détachent des tubes.
- 10.6.6. Ajouter 200 µL de DPBS et mélanger doucement en tapotant le tube 10 à 15 fois pour remettre les cellules en suspension. Placer ces échantillons bouchés dans un bain d'eau glacée.

10.7. Préparation de la station automatisée QIAcube

REMARQUE : Les instructions d'utilisation du robot QIAcube pour l'extraction de l'ADN sont incluses dans ce manuel. L'utilisation d'un robot QIAcube est recommandée, mais n'est pas obligatoire. L'extraction de l'ADN peut être réalisée avec le kit Qiagen DSP DNA Blood Mini Kit sans utiliser un QIAcube.

- 10.7.1. Toutes les étapes pour la station automatisée QIAcube, notamment les procédures d'installation, d'utilisation, de calibration, de nettoyage et de maintenance, sont réalisées conformément aux instructions du fabricant, sauf indication contraire.
- 10.7.1.1. Suivre les recommandations de QIAgen quant à l'entretien à effectuer sur la station automatisée QIAcube, à une exception près. Effectuer le test d'étanchéité tous les mois au lieu de tous les 6 mois.
- 10.7.2. Préparer la station automatisée QIAcube en vue de son utilisation, en chargeant le matériel et les réactifs sur l'appareil.
- 10.7.2.1. Un QIAcube est capable de traiter jusqu'à 12 tubes ; cependant, un des espaces est réservé pour le contrôle d'extraction (utilisé comme contrôle de la contamination au cours de l'extraction et comme contrôle négatif pour la PCR). Il n'est pas possible de traiter 1 seul tube ou 11 tubes à cause du déséquilibre que cela entraînerait pour la centrifugeuse.
- 10.7.2.2. Des tubes de blanc, contenant du DPBS, peuvent être utilisés si le nombre d'extractions requises, contrôle d'extraction compris, est de 11 tubes.
- 10.7.3. Sortir un tube de contrôle d'extraction du congélateur (entre -30°C et -15°C) et le laisser décongeler à température ambiante. Les tubes de contrôle d'extraction peuvent être remis au congélateur après avoir été utilisés. Noter le nombre de cycles de congélation/décongélation.
- 10.7.4. Vortexer le tube de contrôle d'extraction à la vitesse MAXIMALE pendant 5 à 15 secondes. Centrifuger le tube pendant 2 à 5 secondes si du liquide se trouve dans le bouchon. Ajouter 200 µL de contrôle d'extraction dans un tube à échantillon. Ce tube de contrôle d'extraction peut être bouché et conservé entre 2°C et 8°C jusqu'à ce que le programme soit prêt à être lancé.

10.8. Extraction de l'ADN

REMARQUE : Les instructions d'utilisation du robot QIAcube pour l'extraction de l'ADN sont incluses dans ce manuel. L'utilisation d'un robot QIAcube est recommandée, mais n'est pas obligatoire. L'extraction de l'ADN peut être réalisée avec le kit Qiagen DSP DNA Blood Mini Kit sans utiliser un QIAcube.

- 10.8.1. À l'aide d'une pipette, aspirer et refouler les suspensions cellulaires (de l'étape 10.6.6) 4 à 6 fois pour remettre les cellules en suspension. Transférer tout le volume des suspensions cellulaires se trouvant dans la solution DPBS dans des tubes à échantillons. S'assurer que la majorité de la solution se trouve au fond du tube.
- 10.8.2. Placer le tube de contrôle d'extraction en dernière position du programme.
- 10.8.3. Charger le reste des tubes d'échantillons, les réactifs et la solution de protéase aliquotée dans l'instrument.
- 10.8.4. Lancer le programme en s'assurant de faire les sélections suivantes :
- 10.8.4.1. Utiliser le protocole intitulé **QIAamp DNA Blood Mini**.
 - 10.8.4.2. Sélectionner **Blood (Sang)** ou **Body Fluid (Liquide biologique)** comme matériel de départ.
 - 10.8.4.3. Régler le paramètre Elution Volume (Volume d'élution) sur **100 µL**.
- 10.8.5. Une fois l'extraction terminée, boucher les tubes d'échantillons d'ADN et les conserver entre 2°C et 8°C jusqu'à ce que la quantification soit réalisée.

10.9. Quantification et dilution de l'ADN

- 10.9.1. Toutes les étapes pour le spectrophotomètre UV à microvolume, notamment les procédures d'installation, d'utilisation, de calibration, de nettoyage et de maintenance, sont réalisées conformément aux instructions du fabricant, sauf indication contraire.
- 10.9.2. Vortexer les tubes d'échantillons d'ADN à la vitesse MAXIMALE pendant 5 à 15 secondes. À l'aide d'une microcentrifugeuse, centrifuger les tubes d'échantillons d'ADN pendant 2 à 5 secondes pour faire descendre tout le liquide présent dans les bouchons au fond des tubes.
- 10.9.3. Faire le blanc de l'instrument en utilisant 2 µL de tampon d'élution (AE).
- 10.9.4. Faire la mesure de 2 µL de chaque échantillon d'ADN en simple.
- 10.9.5. Si la concentration d'un échantillon d'ADN mesurée est $\leq 9,4$ ng/µL, refaire la quantification de l'échantillon d'ADN deux fois de plus en utilisant de nouveaux aliquots de 2 µL. S'assurer que l'échantillon est bien mélangé afin d'éviter que les mesures obtenues avec le spectrophotomètre UV à microvolume soient erronées. La moyenne de ces trois mesures est considérée comme la concentration finale d'ADN.

REMARQUE : Si la valeur finale de la quantification est $\leq 9,4$ ng/µL, l'échantillon d'ADN ne peut pas être testé avec le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Retraiter l'échantillon afin d'obtenir assez d'ADN.

REMARQUE : Si la valeur finale de la quantification du contrôle d'extraction est $\leq 9,4$ ng/µL, les échantillons d'ADN correspondants ne peuvent pas être testés avec le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Retraiter ces échantillons afin d'obtenir assez d'ADN.

- 10.9.6. Les échantillons d'ADN peuvent être conservés, non dilués, entre -30°C et -15°C pendant un an maximum. Les échantillons d'ADN, dilués ou non dilués à 10 ng/µL peuvent aussi être conservés entre 2°C et 8°C pendant un maximum de 7 jours.

REMARQUE : Les échantillons d'ADN non dilués peuvent subir au maximum 5 cycles de congélation/décongélation.

- 10.9.7. Les échantillons d'ADN $\geq 10,5$ ng/µL doivent être dilués à une concentration de 10 ng/µL en utilisant le tampon d'élution (AE) dans des tubes aux parois non adhérentes. À l'aide de l'équation $C_i V_i = C_f V_f$, calculer le volume V_i après avoir sélectionné le volume final (V_f) dans le Tableau 4.

- $V_i = \frac{(V_f \times 10 \frac{ng}{\mu L})}{C_i}$
- C_i = concentration d'ADN mesurée par le spectrophotomètre UV à microvolume
- C_f = concentration d'ADN finale (10 ng/µL)
- V_i = volume d'ADN non dilué à diluer
- V_f = volume final d'ADN dilué (Tableau 4)
- $V_f - V_i$ = quantité de tampon d'élution (AE) à ajouter à V_i

Tableau 4 : Détermination des volumes finaux par valeur de quantification

Concentration d'ADN mesurée par le spectrophotomètre UV à microvolume (C_i)	Volume final (V_f)
$C_i \leq 9,4$ ng/µL	Ne peut pas être testé
$9,5 \leq C_i \leq 10,4$ ng/µL	Tester tel quel
$10,5 \leq C_i \leq 50,4$ ng/µL	35 µL
$50,5 \leq C_i \leq 200,4$ ng/µL	100 µL
$C_i \geq 200,5$ ng/µL	180 µL

10.10. Amplification

REMARQUE : Toutes les étapes de cette section doivent être réalisées le même jour pour une PCR ITD ou TKD.

REMARQUE : Réduire au maximum l'exposition des mélanges réactionnels à la lumière.

REMARQUE : Réduire au maximum le temps passé par la Taq en dehors de son lieu de conservation (entre -30°C et -15°C).

- 10.10.1. Réaliser toutes les étapes pour le thermocycleur, notamment les procédures d'installation, d'utilisation, de calibration, de nettoyage et de maintenance, conformément aux instructions du fabricant, sauf indication contraire.
- 10.10.2. Laisser tous les mélanges réactionnels (ITD Master Mix [mélange réactionnel pour ITD] et TKD Master Mix [mélange réactionnel pour TKD]) s'équilibrer à température ambiante. Retirer les tubes des contrôles (ITD Positive Control [contrôle positif ITD], TKD Positive Control [contrôle positif TKD], Extraction Control [contrôle d'extraction] et No Template Control [contrôle sans matrice]) du congélateur et les laisser décongeler à température ambiante. Remettre les tubes des contrôles au congélateur après utilisation, en prenant soin de noter le nombre de cycles de congélation/décongélation. Pendant que les réactifs sont en train de s'équilibrer à température ambiante, étiqueter des plaques 96 puits distinctes avec soit le nom « PCR ITD » ou « PCR TKD » (selon le cas) ainsi qu'un identifiant unique.

REMARQUE : Amplifier tous les échantillons sur la même plaque de PCR que le contrôle d'extraction correspondant.

- 10.10.3. Déterminer le nombre de puits (échantillons, contrôles positifs TKD, contrôles positifs ITD, contrôles d'extraction et contrôle sans matrice) devant être testés sur les plaques ITD et TKD. Le nombre total de puits devant être testés par plaque ITD ou TKD = X. Afin d'éviter toute variation lors du pipetage de petits volumes de réactif, la valeur minimale de X est 2.
 - 10.10.3.1. Calculer les volumes de mélange réactionnel et de Taq nécessaires :
 - Volume total de mélange réactionnel = $45 \mu\text{L} \times (X + 3)$
 - Volume total de Taq = $0,2 \mu\text{L} \times (X + 3)$
 - Les trois (3) échantillons supplémentaires ajoutés à X tiennent compte des erreurs de pipetage.
- 10.10.4. Vortexer le mélange réactionnel, les contrôles et les tubes d'échantillons d'ADN à la vitesse MAXIMALE pendant 5 à 15 secondes.
- 10.10.5. Sortir la Taq du congélateur (entre -30°C et -15°C). Ne pas vortexer.
- 10.10.6. À l'aide d'une microcentrifugeuse, centrifuger tous les tubes (y compris celui de la Taq) pendant 2 à 5 secondes pour faire descendre tout le liquide présent dans les bouchons au fond des tubes.
- 10.10.7. Ajouter les volumes calculés de mélange réactionnel et de Taq dans des tubes étiquetés de volume approprié pour les plaques ITD et TKD.
- 10.10.8. Boucher et vortexer les tubes à la vitesse MAXIMALE pendant 5 à 15 secondes pour mélanger. À l'aide d'une microcentrifugeuse, centrifuger, dans la mesure du possible, pendant 2 à 5 secondes. Remettre la Taq au congélateur (entre -30°C et -15°C).
- 10.10.9. Aliquoter 45 μL du mélange constitué du mélange réactionnel et de la Taq dans les puits appropriés du plan de la plaque de PCR.
- 10.10.10. Ajouter 5 μL des échantillons d'ADN à 10 ng/ μL et des contrôles dans les puits appropriés de la plaque 96 puits selon le plan de la plaque de PCR.
- 10.10.11. Sceller les colonnes de la plaque de PCR avec des barrettes de bouchons pour puits. Centrifuger la plaque 96 puits à 1 400 g pendant 1 minute.
- 10.10.12. Placer la plaque de PCR dans un thermocycleur et fermer le couvercle. Programmer le thermocycleur en suivant les étapes listées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Programmes d'amplification par PCR du thermocycleur

Étape	Programme <i>FLT3</i> ITD CDx	Programme <i>FLT3</i> TKD CDx
1	95°C pendant 11 minutes	94,5°C pendant 11 minutes
2	94°C pendant 30 secondes	93,5°C pendant 30 secondes
3	57°C pendant 60 secondes	56,5°C pendant 60 secondes
4	72°C pendant 2 minutes	71,5°C pendant 2 minutes
5	Répéter les étapes 2 à 4, 24 fois	Répéter les étapes 2 à 4, 28 fois
6	94°C pendant 30 secondes	93,5°C pendant 30 secondes
7	60°C pendant 45 minutes	59,5°C pendant 45 minutes
8	4°C pendant une durée infinie (∞)	4°C pendant une durée infinie (∞)
Vitesse de montée en température 75 %		

- 10.10.13. Appuyer sur **Run (Programme)** pour passer à l'écran suivant. S'assurer que le paramètre du volume de la réaction est défini sur $50\ \mu\text{L}$, que celui de la température du couvercle est défini sur $105,0^{\circ}\text{C}$ et que le couvercle sera chauffé durant le programme de PCR. Appuyer sur **Start Run Now (Lancer le programme)** pour lancer le programme de PCR.
- 10.10.14. Ranger les réactifs et l'ADN restants. Remettre les mélanges réactionnels ouverts au congélateur (entre -30°C et -15°C). Noter le nombre de cycles de congélation/décongélation.
- 10.10.15. Une fois le protocole de PCR terminé, la plaque de PCR peut être conservée entre 2°C et 8°C pendant un maximum de 72 heures. Sinon, pour les plaques TKD, passer à la section 10.11 : *Digestion par enzyme de restriction (mutation TKD uniquement)* et pour les plaques ITD, passer à la section 10.12 : *Détection par électrophorèse capillaire*.

10.11. Digestion par enzyme de restriction (mutation TKD uniquement)

REMARQUE : Réaliser toutes les étapes de cette section le même jour.

REMARQUE : Effectuer la digestion par enzyme de restriction sur les amplicons TKD uniquement.

REMARQUE : Réduire au maximum le temps passé par l'enzyme EcoRV en dehors de son lieu de conservation (entre -30°C et -15°C).

- 10.11.1. Décongeler un tube de NEBuffer r3.1 à température ambiante.
- 10.11.2. Pendant que les réactifs sont en train de s'équilibrer à température ambiante, étiqueter une plaque 96 puits avec le nom « digestion TKD » ainsi qu'un identifiant unique.
 - Déterminer le nombre de puits (échantillons et contrôles) devant être digérés sur la plaque. Le nombre total d'échantillons devant être digérés = Y. Afin d'éviter toute variation lors du pipetage de petits volumes de réactif, la valeur minimale de Y est 4.
- 10.11.2.1. Calculer les volumes de NEBuffer r3.1 et d'EcoRV nécessaires :
 - Volume total de NEBuffer r3.1 = $1,1\ \mu\text{L} \times (Y + 6)$
 - Volume total d'EcoRV = $0,5\ \mu\text{L} \times (Y + 6)$
 - Les six (6) échantillons supplémentaires ajoutés à Y tiennent compte des erreurs de pipetage.
- 10.11.3. Vortexer le tube de NEBuffer r3.1 à la vitesse MAXIMALE pendant 5 à 15 secondes.
- 10.11.4. Sortir l'EcoRV du congélateur (entre -30°C et -15°C). Ne pas vortexer.
- 10.11.5. À l'aide d'une microcentrifugeuse, centrifuger tous les tubes (y compris celui de l'EcoRV) pendant 2 à 5 secondes pour faire descendre tout le liquide présent dans les bouchons au fond des tubes.
- 10.11.6. Ajouter les volumes calculés de NEBuffer r3.1 et d'EcoRV dans un tube étiqueté de volume approprié.
- 10.11.7. Mélanger la solution en l'aspirant et en la refoulant 5 à 10 fois avec une pipette. Remettre l'EcoRV au congélateur (entre -30°C et -15°C).
- 10.11.8. Aliquoter $1,5\ \mu\text{L}$ de la solution de mélange pour la digestion dans les puits appropriés de la plaque de digestion.
- 10.11.9. Sortir la plaque de PCR TKD du thermocycleur ou de son lieu de stockage entre 2°C et 8°C (il n'est pas nécessaire d'équilibrer la plaque à température ambiante) et la centrifuger à 1 400 g pendant 1 minute.
- 10.11.10. Ajouter $8,5\ \mu\text{L}$ des échantillons de la plaque de PCR dans les puits appropriés de la plaque de digestion. Sceller les colonnes de la plaque de digestion avec des barrettes de bouchons pour puits.
- 10.11.11. Centrifuger la plaque à 1 400 g pendant 1 minute.
- 10.11.12. Placer la plaque de digestion dans un thermocycleur et fermer le couvercle.
- 10.11.13. Programmer le thermocycleur en suivant les étapes listées ci-dessous (vitesse de montée en température 75 %) :
 - Étape 1 : 37°C pendant 1 heure
 - Étape 2 : 65°C pendant 10 minutes
 - Étape 3 : 4°C pendant une durée infinie (∞)
- 10.11.14. Appuyer sur **Run (Programme)** pour passer à l'écran suivant. S'assurer que le paramètre du volume de la réaction est défini sur $10\ \mu\text{L}$, que celui de la température du couvercle est défini sur $105,0^{\circ}\text{C}$ et que le couvercle sera chauffé durant le programme de digestion. Appuyer sur **Start Run Now (Lancer le programme)** pour lancer le programme de digestion.
- 10.11.15. Une fois le protocole de digestion terminé, la plaque de digestion peut être conservée entre 2°C et 8°C pendant un maximum de 72 heures, en réduisant au maximum l'exposition à la lumière. Sinon, passer à la section 10.12 : *Détection par électrophorèse capillaire*.

10.12. Détection par électrophorèse capillaire

REMARQUE : Réduire au maximum le temps passé par le tube de marqueur de taille LIZ en dehors de son lieu de conservation (entre 2°C et 8°C).

REMARQUE : L'analyseur 3500xL effectue les analyses par groupe de 24 capillaires, appelé une injection, comprenant 3 colonnes et 8 rangées sur une plaque 96 puits. Chaque capillaire correspond à un puits. Il n'y a pas d'injections partielles bien que les injections puissent être programmées indépendamment.

- 10.12.1. Toutes les étapes pour l'analyseur 3500xL, notamment les procédures d'installation, d'utilisation, de calibration, de nettoyage et de maintenance, sont réalisées conformément aux instructions du fabricant, sauf indication contraire.
- 10.12.2. Les tests ITD et TKD doivent être réalisés sur des injections séparées et avec des paramètres d'injection différents. Les paramètres de l'analyseur 3500xL pour les tests ITD et TKD sont repris dans le Tableau 6. Ils peuvent être sauvegardés dans l'analyseur 3500xL afin de les réutiliser plus tard.

Tableau 6 : Paramètres de l'analyseur génétique 3500xL

Paramètre	Paramètres du test ITD CDx	Paramètres du test TKD CDx
Injection Time (Durée de l'injection)	12 s	7 s
Injection Voltage (Tension de l'injection)	1,2 kV	1,0 kV
Capillary Length (Longueur du capillaire)	50 cm	
Polymer (Polymère)	POP-7	
Dye Set (Jeu de fluorophores)	G5	
Oven Temp (Température du four)	60°C	
Run Time (Durée du programme)	1 630 s	
Run Voltage (Tension du programme)	19,5 kV	
PreRun Time (Durée avant le début du programme)	180 s	
PreRun Voltage (Tension avant le début du programme)	15 kV	
Data Delay (Retard des données)	1 s	

- 10.12.3. Dans le tableau de bord du 3500xL, cliquer sur **Refresh (Actualiser)** pour mettre à jour la durée d'utilisation des consommables sur l'instrument et le nombre d'injections effectuées. Consulter le tableau de bord du 3500xL afin de s'assurer que les tampons, le polymère et le capillaire n'ont pas dépassé le temps maximum autorisé pour ce test, listés dans le Tableau 7. Vérifier que le nombre d'échantillons (pas uniquement les injections) restant pour le polymère POP-7 est suffisant pour le programme. Si un consommable doit être remplacé, effectuer les opérations d'entretien nécessaires avant.

Tableau 7 : Durées maximales permises à bord de l'analyseur pour les consommables utilisés sur l'analyseur 3500xL

Consommables utilisés sur le 3500xL	Durée maximale permise sur l'instrument
Polymère POP-7	7 jours
Tampon anode	7 jours
Tampon cathode	7 jours
Réseau de capillaires pour l'analyseur 3500xL	400 injections

10.13. Préparation de la solution de marqueur de taille (si nécessaire)

- 10.13.1. La solution de marqueur de taille est constituée d'un mélange du marqueur de taille LIZ et de formamide Hi-Di.
- 10.13.2. Sortir un tube de solution de marqueur de taille du réfrigérateur (entre 2°C et 8°C), s'il y en a un de disponible, et passer à l'étape 10.13.6. Sinon, préparer un tube de solution de marqueur de taille en effectuant les trois étapes suivantes.
- 10.13.3. Décongeler un flacon de formamide Hi-Di à température ambiante. Sortir un tube de marqueur de taille LIZ du réfrigérateur.
- 10.13.4. Vortexer les tubes à la vitesse MAXIMALE pendant 5 à 15 secondes. Centrifuger ensuite les tubes pendant 2 à 5 secondes dans une microcentrifugeuse.
- 10.13.5. Ajouter 56 µL du marqueur de taille LIZ à 1 mL de formamide Hi-Di. Étiqueter le tube de solution de marqueur de taille en indiquant la date.
- 10.13.6. Vortexer le tube de solution de marqueur de taille à la vitesse MAXIMALE pendant 5 à 15 secondes. Centrifuger ensuite le tube pendant 2 à 5 secondes dans une microcentrifugeuse. Toute solution non utilisée peut être conservée entre 2°C et 8°C pendant 7 jours maximum. Jeter après 7 jours.

10.14. Préparation de la plaque des échantillons

10.14.1. Centrifuger la plaque de PCR ITD et/ou la plaque de digestion TKD 96 puits à 1 400 g pendant 1 minute.

REMARQUE : Les tests ITD et TKD peuvent tous deux être réalisés sur la même plaque d'électrophorèse capillaire (EC) ; cependant, ils doivent être séparés dans des injections distinctes.

10.14.2. Étiqueter une plaque 96 puits avec soit le nom « EC ITD » et/ou « EC TKD » (selon le cas) ainsi qu'un identifiant unique.

10.14.3. Déterminer le nombre de puits nécessaires pour un programme.

- Nombre de puits = $24X$
 - X = nombre d'injections.
- Calculer le volume de solution de marqueur de taille nécessaire.
 - Volume maximum de solution de marqueur de taille = $9,5 \mu\text{L} \times (24X + 4)$
 - Les quatre (4) échantillons supplémentaires ajoutés à X tiennent compte des erreurs de pipetage.

10.14.4. Ajouter 9,5 μL de solution de marqueur de taille dans les puits de la plaque d'électrophorèse capillaire contenant les échantillons. Ajouter 9,5 μL soit de solution de marqueur de taille soit de formamide Hi-Di uniquement dans les puits restants qui seront injectés (multiple de 24) mais qui ne contiennent pas d'échantillons.

REMARQUE : Les 24 puits compris dans une injection doivent contenir soit un échantillon mélangé à la solution de marqueur de taille, soit de la solution de marqueur de taille seule, soit de la solution de formamide Hi-Di seule.

10.14.5. À partir de chaque puits de la plaque de PCR (ITD uniquement) ou de la plaque de digestion (TKD uniquement), transférer 0,5 μL de produit de PCR ou de produit digéré dans le puits correspondant sur la plaque d'électrophorèse capillaire à l'aide d'une pipette multicanaux.

REMARQUE : Une pipette monocanal peut être utilisée pour transférer le produit de PCR /le produit digéré lorsque des puits individuels sont testés de nouveau.

10.14.6. Sceller la plaque d'électrophorèse capillaire avec un film d'aluminium et centrifuger la plaque à 1 400 g pendant 1 minute.

10.14.7. Placer la plaque d'électrophorèse capillaire dans un thermocycleur et fermer le couvercle.

10.14.8. Programmer le thermocycleur en suivant les étapes listées ci-dessous (vitesse de montée en température 75 %) :

- Étape 1 : 95°C pendant 3 minutes
- Étape 2 : 4°C pendant 5 minutes

10.14.9. Appuyer sur **Run (Programme)** pour passer à l'écran suivant. S'assurer que le paramètre du volume de la réaction est défini sur 10 μL , que celui de la température du couvercle est défini sur 105,0°C et que le couvercle sera chauffé durant le programme. Appuyer sur **Start Run Now (Lancer le programme)** pour lancer le programme.

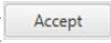
10.14.10. Une fois le programme terminé, confirmer l'absence de bulles en inspectant de visu les puits de la plaque. S'il y a des bulles, les retirer en centrifugeant la plaque d'électrophorèse capillaire à 1 400 g pendant 1 minute.

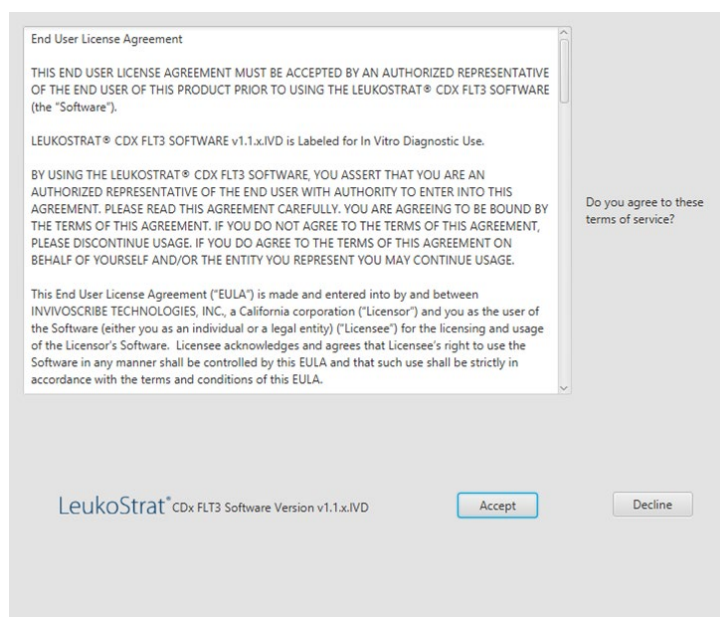
10.14.11. Préparer chaque assemblage de plaque en plaçant la plaque d'électrophorèse capillaire sur un socle de plaque 96 puits pour analyseur 3500xL, en vérifiant que les coins coupés s'alignent. Retirer le film d'aluminium et placer un nouveau septum pour plaque 96 puits sur la plaque en s'assurant que le septum est bien à plat et que tous les orifices du septum sont dégagés. Monter un support de plaque 96 puits pour analyseur 3500xL.

10.15. Configuration de PlateMapper avec le logiciel LeukoStrat CDx FLT3

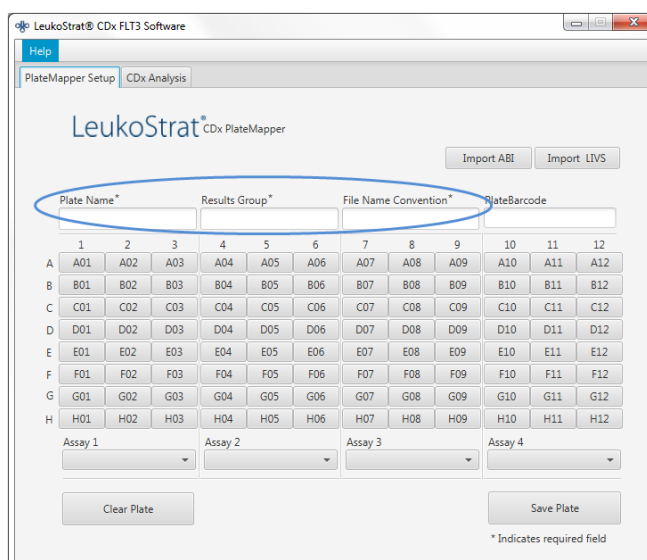
10.15.1. Installer le logiciel LeukoStrat CDx FLT3.

- 10.15.1.1. Copier le fichier *LeukoStratCDx v1.1.x.IVD_setup.exe* du CD du logiciel sur un disque local sur votre ordinateur.
- 10.15.1.2. Double-cliquer sur le fichier **LeukoStratCDx v1.1.x.IVD_setup.exe**. Il est possible qu'une boîte de dialogue intitulée *User Account Control (Contrôle du compte utilisateur)* s'affiche. Cliquer sur **Yes (Oui)** pour continuer l'installation.
- 10.15.1.3. La boîte de dialogue du programme d'installation *LeukoStratCDx v1.1.x.IVD Excelsior* s'affiche. Cliquer sur **Next (Suivant)**.
- 10.15.1.4. Choisir d'installer cette application pour n'importe quelle personne utilisant cet ordinateur en sélectionnant *Anyone who uses this computer (Tous les utilisateurs de cet ordinateur)*. Cliquer sur **Next (Suivant)**.

- 10.15.1.5. Choisir un emplacement d'installation pour le dossier de destination dans *Destination folder (Dossier de destination)*. Cliquer sur **Next (Suivant)**.
- 10.15.1.6. Dans la boîte de dialogue *Program Folder (Dossier du programme)*, « Invivoscribe, Inc\LeukoStratCDx v1.1.x.IVD » est l'emplacement par défaut. Cliquer sur **Next (Suivant)**, puis cliquer de nouveau sur **Next (Suivant)** dans la fenêtre suivante. L'installation commence. Fermer la fenêtre lorsque l'installation est terminée.
- 10.15.2. Ouvrir le logiciel *LeukoStrat CDx FLT3*. Cliquer sur **Accept (Accepter)** () pour accepter les conditions de service.



- 10.15.3. Dans l'onglet *PlateMapper Setup (Configuration de PlateMapper)*, renseigner les trois champs obligatoires situés au-dessus du plan de plaque. Ces champs obligatoires sont *Plate Name (Nom de la plaque)*, *Results Group (Groupe de résultats)* et *File Name Convention (Convention de nom de fichier)* (entourés ci-dessous).
- 10.15.3.1. Les noms des plans de plaques ne peuvent contenir que 50 caractères maximum ; et ils peuvent inclure les caractères suivants [A-Z, a-z, 0-9], des espaces uniques et des tirets.
- 10.15.3.2. Les données des champs *Results Group (Groupe de résultats)* et *File Name Convention (Convention de nom de fichier)* doivent correspondre aux données programmées par l'utilisateur sur l'analyseur 3500xL (sélectionnées à l'étape 10.16.13).



- 10.15.4. Le plan de plaque permet de saisir quatre tests par plaque (3 colonnes par test). Chaque test correspond à l'injection qui se fera durant le programme sur l'analyseur 3500xL. Un seul test peut être réalisé par injection (ITD ou TKD).

LeukoStrat® CDx FLT3 Software

PlateMapper Setup | CDx Analysis

LeukoStrat® CDx PlateMapper

Import ABI | Import LIVS

Plate Name* | Results Group* | File Name Convention* | Plate Barcode

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
B	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
C	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
F	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
G	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
H	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

Assay 1 | Assay 2 | Assay 3 | Assay 4

Clear Plate | Save Plate

* Indicates required field

- 10.15.5. Sélectionner le test dans le menu déroulant () qui correspond aux échantillons qui sont situés au-dessus de celui-ci dans l'écran *PlateMapper Setup* (*Configuration de PlateMapper*).

LeukoStrat® CDx FLT3 Software

PlateMapper Setup | CDx Analysis

LeukoStrat® CDx PlateMapper

Import ABI | Import LIVS

Plate Name* | Results Group* | File Name Convention* | Plate Barcode

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
B	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
C	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
F	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
G	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
H	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

Assay 1 | Assay 2 | Assay 3 | Assay 4

ITD
TKD

Save Plate

* Indicates required field

10.15.6. Dans le plan de plaque, saisir les informations pour chaque puits qui contiendra un échantillon ou un contrôle à analyser.

REMARQUE : Lors de la saisie des informations, commencer par les contrôles, c.-à-d. Extraction Control (EC) (Contrôle d'extraction), Positive Control (PC) (Contrôle positif) et No Template Control (NTC) (Contrôle sans matrice). Les contrôles peuvent être placés n'importe où sur la plaque, pas nécessairement dans les trois premiers puits. Saisir ensuite les informations pour les puits des échantillons SAMPLE (ÉCHANTILLON) car ils doivent être liés à leur contrôle d'extraction correspondant. Les contrôles positifs et les contrôles sans matrice ne sont pas liés aux contrôles d'extraction.

10.15.6.1. Pour saisir les informations, cliquer sur le puits respectif (*p.ex.* A01) et la fenêtre contextuelle suivante s'affiche :

LeukoStrat® CDx Edit Well

Sample Name:

Well ID: A01

Sample Type:

Run: +

EC:

Sample Notes (optional):

Clear Well Save Well

10.15.7. Saisir un nom d'échantillon décrivant le puits dans le champ *Sample Name* (Nom de l'échantillon). Les noms des échantillons ne peuvent contenir que 50 caractères maximum ; et ils peuvent inclure les caractères suivants [A-Z, a-z, 0-9], des espaces uniques et des tirets.

10.15.7.1. L'utilisateur peut également importer des noms d'échantillons sur le plan de plaque à l'aide du fichier *3500 Plate Layout File Version 1.0* (Fichier de plan de plaque 3500 Version 1.0) de Thermo Fisher Scientific. Saisir les noms d'échantillons dans le fichier *3500 Plate Layout File* (Fichier de plan de plaque 3500) et importer en cliquant sur le bouton **Import ABI** (Importer ABI).

LeukoStrat® CDx FLT3 Software

PlateMapper Setup CDx Analysis

LeukoStrat® CDx PlateMapper

Import ABI Import LIVS

Plate Name* Results Group* File Name Convention* PlateBarcode

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
B	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
C	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
F	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
G	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
H	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

Assay 1 Assay 2 Assay 3 Assay 4

Clear Plate Save Plate

* Indicates required field

10.15.8. Sélectionner le type d'échantillon pour chaque puits dans le menu déroulant **Sample Type (Type d'échantillon)**. Les options sont les suivantes :

- SAMPLE (ÉCHANTILLON) = échantillon inconnu à analyser
- EC = contrôle d'extraction
- NTC = contrôle sans matrice
- PC = contrôle positif

LeukoStrat® CDx Edit Well

Sample Name:

Well ID: A01

Sample Type:
 SAMPLE
 EC
 NTC
 PC
 EC

Sample Notes (optional):

Clear Well Save Well

10.15.9. Sélectionner le numéro du programme dans le menu déroulant **Run (Programme)**. Pour ajouter un nouveau numéro de programme, cliquer sur le signe « + » à côté du menu déroulant.

REMARQUE : Un « programme » est défini par tous les échantillons, un contrôle positif en simple exemplaire, tous les contrôles d'extraction associés aux échantillons faisant partie du test et un contrôle sans matrice en simple exemplaire. Des programmes peuvent concerner plusieurs injections et plusieurs programmes peuvent être testés sur une seule plaque.

LeukoStrat® CDx Edit Well

Sample Name:

Well ID: A01

Sample Type:
 SAMPLE

Run:
 1

Sample Notes (optional):

Clear Well Save Well

- 10.15.9.1. Dans le menu déroulant, sélectionner le contrôle d'extraction (EC) associé (nécessaire uniquement si le type d'échantillon dans *Sample Type [Type d'échantillon]* est *SAMPLE [ÉCHANTILLON]*). On peut associer jusqu'à 11 échantillons à un seul contrôle d'extraction.

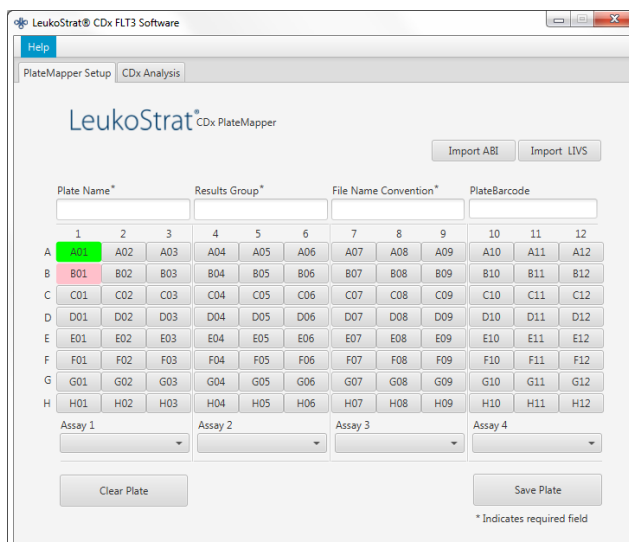
The screenshot shows the 'LeukoStrat[®] CDx Edit Well' window. The 'Sample Name' field contains 's01'. The 'Well ID' is 'A01'. The 'Sample Type' dropdown is set to 'SAMPLE'. The 'Run' dropdown is set to '1'. The 'EC' dropdown menu is open, showing 'B01' as the selected option. The 'Sample Notes (optional)' field is empty. At the bottom, there are 'Clear Well' and 'Save Well' buttons.

- 10.15.10. Pour saisir des commentaires supplémentaires sur l'échantillon ou le contrôle, utiliser le champ *Sample Notes (Remarques sur l'échantillon)*. Ces commentaires apparaîtront dans le rapport intitulé *Sample Report (Compte-rendu de l'échantillon)*.
- 10.15.11. Une fois toutes les informations saisies pour le puits, cliquer sur **Save Well (Enregistrer le puits)**. Pour effacer le contenu du puits, cliquer sur **Clear Well (Effacer le puits)**.

This screenshot is identical to the previous one, but with blue circles highlighting the 'Clear Well' and 'Save Well' buttons at the bottom of the window to draw attention to them.

- 10.15.12. Une fois le puits enregistré, la couleur du puits changera. Le puits s'affiche en rouge tant qu'il n'a pas été correctement configuré. Ensuite, il devient vert (comme illustré ci-dessous).

REMARQUE : Si la configuration est correcte, la couleur du puits du contrôle d'extraction ne passera au vert que lorsque le curseur se trouvera au-dessus de ce puits.



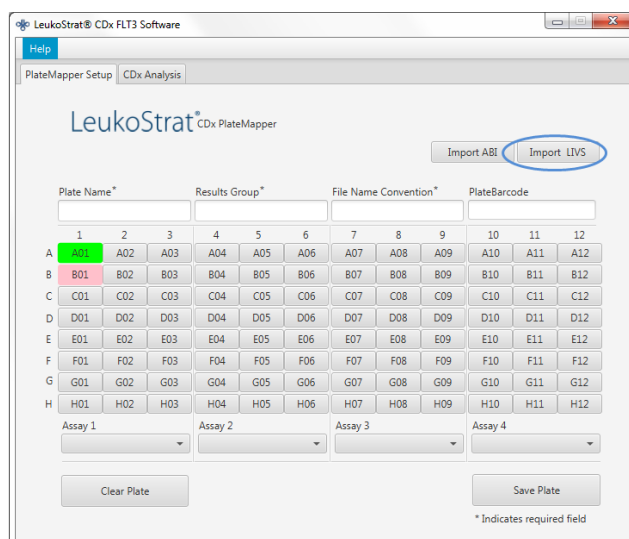
- 10.15.13. Continuer de saisir les puits sur l'écran *PlateMapper Setup (Configuration de PlateMapper)* jusqu'à ce que tous les puits présentant des informations soient sélectionnés en vert.
- 10.15.14. Lorsque tous les puits ont été saisis, cliquer sur **Save Plate (Enregistrer la plaque)** et une invite demandera à l'utilisateur où enregistrer le fichier ABI (3500 Plate Layout File Version 1.0 [Fichier de plan de plaque 3500 Version 1.0]) et le fichier LIVS généré par le logiciel. Pour chaque configuration de plaque, un fichier ABI et un fichier LIVS seront générés.

REMARQUE : Ne pas modifier le fichier ABI généré par le logiciel LeukoStrat CDx *FLT3*. Ceci engendre une erreur lorsque le fichier est téléchargé sur l'analyseur 3500xL.

REMARQUE : Si le logiciel LeukoStrat CDx *FLT3* fonctionne pendant la génération d'un plan de plaque, les identifiants des programmes attribués automatiquement dans les fichiers de résultats ne seront pas uniques et seront répétés dans les différents programmes.

- 10.15.14.1. L'utilisateur peut examiner le fichier LIVS créé en cliquant sur **Import LIVS (Importer LIVS)** et en naviguant jusqu'à l'emplacement où le fichier a été enregistré.

REMARQUE : La fonction **Import LIVS (Importer LIVS)** ne sert qu'à passer en revue le plan de plaque. Le fichier LIVS ne peut pas être modifié pour créer un nouveau plan de plaque qui serait utilisé pour un autre programme. Ceci causerait une erreur.



- 10.15.15. L'utilisateur continuera d'utiliser le logiciel lorsque le programme sur l'analyseur 3500xL sera terminé.
- 10.15.16. Utiliser le fichier ABI qui a été généré par le logiciel LeukoStrat CDx *FLT3* afin de télécharger la plaque sur l'analyseur 3500xL.
- 10.15.17. Si l'enregistrement de la plaque échoue, suivre les recommandations indiquées dans le Tableau 8. Pour toute assistance supplémentaire, veuillez contacter le support technique Invivoscribe à l'adresse électronique support@invivoscribe.com.

Tableau 8 : Messages d'erreur liés à l'enregistrement de la plaque et actions correctives

Message d'erreur lié à l'enregistrement de la plaque [code]	Cause(s) probable(s)	Action(s) corrective(s)
<ul style="list-style-type: none"> Corrupted sample detected. [PM01] (Échantillon corrompu détecté.) Could not detect well for object UUID. [PM02] (Impossible de détecter le puits pour l'identifiant universel unique de l'objet.) Control detected unknown links for well (A-H, 01-12). [PM03] (Le contrôle a détecté des liens inconnus pour le puits [A-H, 01-12].) 	Tentative de téléchargement d'un fichier LIVS modifié.	Ne pas modifier le fichier LIVS. Si le fichier est corrompu, un nouveau fichier LIVS doit être créé.
<ul style="list-style-type: none"> Missing required field "Plate Name". [PM04] (Champ obligatoire « Plate Name [Nom de la plaque] » manquant.) Illegal character detected in "Plate Name". [PM05] (Caractère inacceptable détecté dans « Plate Name [Nom de la plaque] ».) Multiple spaces detected in "Plate Name". [PM06] (Détection de plusieurs espaces dans « Plate Name [Nom de la plaque] ».) Plate Name must be 50 characters or less. [PM28] (Le nom de la plaque doit contenir 50 caractères maximum.) 	Les instructions données dans le mode d'emploi pour créer un nom de plaque n'ont pas été suivies.	Le nom d'un plan de plaque ne peut contenir que 50 caractères maximum ; et il peut inclure les caractères suivants [A-Z, a-z, 0-9], des espaces uniques et des tirets.
<ul style="list-style-type: none"> Missing required field "Result Group". [PM07] (Champ obligatoire « Result Group [Groupe de résultats] » manquant.) 	Les instructions données dans le mode d'emploi pour créer un nom pour un groupe de résultats dans le champ <i>Result Group (Groupe de résultats)</i> n'ont pas été suivies.	Le groupe de résultats du champ <i>Result Group (Groupe de résultats)</i> est défini sur l'analyseur 3500xL.
<ul style="list-style-type: none"> Missing required field "File Naming Convention". [PM08] (Champ obligatoire « File Naming Convention [Convention de nom de fichier] » manquant.) 	Les instructions données dans le mode d'emploi pour créer un nom pour une convention de nom de fichier dans le champ <i>File Naming Convention (Convention de nom de fichier)</i> n'ont pas été suivies.	La convention de nom de fichier du champ <i>File Naming Convention (Convention de nom de fichier)</i> est définie sur l'analyseur 3500xL.
<ul style="list-style-type: none"> Assay not selected for all samples. [PM09] (Le test n'a pas été sélectionné pour tous les échantillons.) Run contains more than 1 Assay type. [PM10] (Le programme contient plus d'1 type de test.) 	Les instructions données dans le mode d'emploi pour l'attribution du type de test n'ont pas été suivies.	Un type de test doit être attribué à tous les puits, et un programme ne peut contenir plus d'un type de test.
<ul style="list-style-type: none"> Sample name not detected for well (A-H, 01-12). [PM11] (Le nom de l'échantillon n'a pas été détecté pour le puits [A-H, 01-12].) Illegal character detected in Sample Name. [PM12] (Un caractère inacceptable a été détecté dans le nom de l'échantillon.) Multiple spaces detected in Sample Name. [PM13] (Plusieurs espaces qui se suivent ont été détectés dans le nom de l'échantillon.) Sample name must be 50 characters or less. [PM14] (Un nom d'échantillon ne doit contenir que 50 caractères maximum.) 	Les instructions données dans le mode d'emploi pour créer un nom d'échantillon n'ont pas été suivies.	Un nom d'échantillon ne peut contenir que 50 caractères maximum ; et il peut inclure les caractères suivants [A-Z, a-z, 0-9], des espaces uniques et des tirets.

Tableau 8 : Messages d'erreur liés à l'enregistrement de la plaque et actions correctives

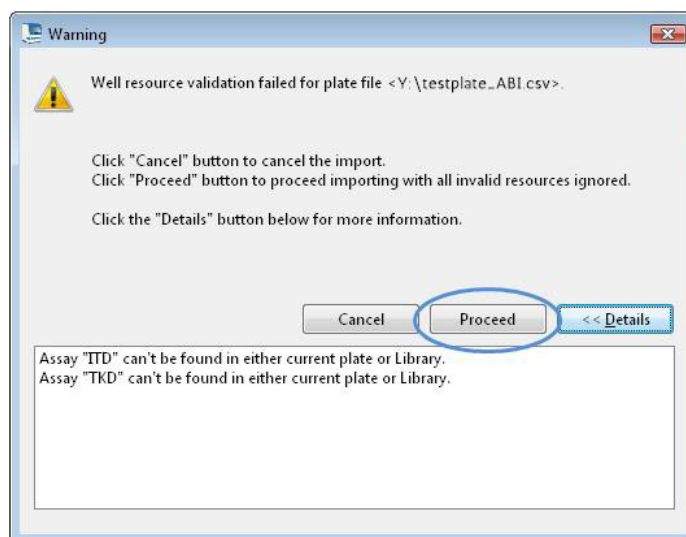
Message d'erreur lié à l'enregistrement de la plaque [code]	Cause(s) probable(s)	Action(s) corrective(s)
<ul style="list-style-type: none"> Sample Type not selected for well (A-H, 01-12). [PM15]. (Le type d'échantillon n'a pas été sélectionné pour le puits [A-H, 01-12].) 	Les instructions données dans le mode d'emploi pour sélectionner un type d'échantillon n'ont pas été suivies.	Un type d'échantillon doit être attribué à tous les puits. Les options sont les suivantes : <i>PC (Contrôle positif)</i> , <i>NTC (Contrôle sans matrice)</i> , <i>EC (Contrôle d'extraction)</i> et <i>SAMPLE (ÉCHANTILLON)</i> .
<ul style="list-style-type: none"> Run not selected for well (A-H, 01-12). [PM16] (Le programme n'a pas été sélectionné pour le puits [A-H, 01-12].) No Runs created for Plate. [PM17] (Aucun programme n'a été créé pour la plaque.) 	Les instructions données dans le mode d'emploi pour sélectionner les programmes n'ont pas été suivies.	<p>Un programme doit être attribué à tous les puits. Le premier puits auquel un programme est attribué requiert de la part de l'utilisateur d'augmenter le nombre de programmes (bouton « + » à côté du menu déroulant <i>Run [Programme]</i>).</p> <p>Pour les puits suivants, on peut soit augmenter le nombre de programmes ou sélectionner un nombre de programmes utilisé précédemment.</p>
<ul style="list-style-type: none"> EC not selected for well (A-H, 01-12). [PM18] (Aucun contrôle d'extraction n'a été sélectionné pour le puits [A-H, 01-12].) Sample attached to unknown EC for well (A-H, 01-12). [PM19] (L'échantillon est associé à un contrôle d'extraction inconnu pour le puits [A-H, 01-12].) EC selected on control for well (A-H, 01-12). [PM20] (Un contrôle d'extraction a été sélectionné pour un contrôle pour le puits [A-H, 01-12].) No samples linked to EC for well (A-H, 01-12). [PM21] (Aucun échantillon n'est lié à un contrôle d'extraction pour le puits [A-H, 01-12].) 	<ul style="list-style-type: none"> Les instructions données dans le mode d'emploi pour l'attribution des contrôles d'extraction n'ont pas été suivies. Tentative de téléchargement d'un fichier LIVS modifié. 	Un contrôle d'extraction doit être attribué à chaque puits de type <i>SAMPLE (ÉCHANTILLON)</i> . Ne pas attribuer un contrôle d'extraction à un puits de contrôle. Chaque contrôle d'extraction doit être lié à au moins un échantillon.
<ul style="list-style-type: none"> Run missing PC, NTC, EC. [PM22] (Le programme n'a aucun contrôle positif, contrôle sans matrice ni contrôle d'extraction.) Run detected control in sample list. [PM23] (Le programme a détecté un contrôle dans la liste des échantillons.) Run missing samples. [PM24] (Il manque des échantillons dans le programme.) Run contains more than 1 Assay type. [PM25] (Le programme contient plus d'1 type de test.) 	<ul style="list-style-type: none"> Les instructions données dans le mode d'emploi pour l'attribution des programmes n'ont pas été suivies. Tentative de téléchargement d'un fichier LIVS modifié. 	<p>Chaque programme doit contenir un contrôle de chaque type (PC [Contrôle positif], NTC [Contrôle sans matrice], EC [Contrôle d'extraction]).</p> <p>Un programme doit contenir au moins un puits de type <i>SAMPLE (ÉCHANTILLON)</i>. Un programme ne doit contenir exactement qu'un type de test.</p>
<ul style="list-style-type: none"> Too many samples linked to EC for well (A-H, 01-12). [PM26] (Trop d'échantillons sont liés à un contrôle d'extraction pour le puits [A-H, 01-12].) EC linked to more than one run for well (A-H, 01-12). [PM27] (Contrôle d'extraction lié à plus d'un programme pour le puits [A-H, 01-12].) 	Les instructions données dans le mode d'emploi pour l'attribution des contrôles d'extraction n'ont pas été suivies.	Un contrôle d'extraction individuel ne peut être lié qu'à 11 échantillons maximum. Un contrôle d'extraction unique ne peut pas être lié à des échantillons sur plus d'un programme.

10.16. Configuration du logiciel de l'analyseur 3500xL

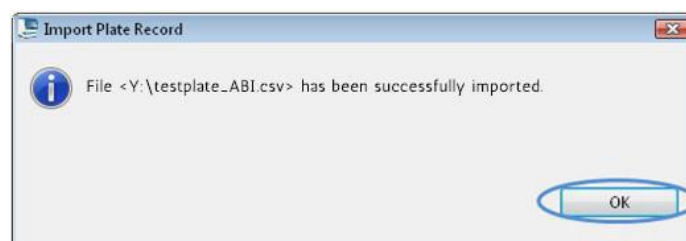
REMARQUE : Le logiciel LeukoStrat CDx *FLT3* crée un fichier à importer dans l'analyseur 3500xL (fichier ABI) qui ajoute des informations au nom de l'échantillon. Le logiciel de l'analyseur 3500xL peut ajouter d'autres informations.

10.16.1. Toutes les étapes pour l'analyseur 3500xL, notamment les procédures d'installation, d'utilisation, de calibration, de nettoyage et de maintenance, sont réalisées conformément aux instructions du fabricant, sauf indication contraire.

- 10.16.2. Dans l'écran du tableau de bord de l'analyseur 3500xL, cliquer sur le bouton **Create New Plate (Créer une nouvelle plaque)**.
- 10.16.3. Saisir une brève description pour le nom de la plaque dans *Plate Name (Nom de plaque)*.
- 10.16.4. S'assurer que le nombre de puits est défini sur 96.
- 10.16.5. Pour le type de plaque, sélectionner **Fragment (Fragment)** dans le menu déroulant.
- 10.16.6. S'assurer que la longueur du capillaire est de 50 cm et que le polymère est POP7.
- 10.16.7. Saisir les initiales de l'opérateur dans la section *Owner (Responsable)*.
- 10.16.8. Cliquer sur Assign Plate Contents (Attribuer le contenu de la plaque).
- 10.16.9. Cliquer sur le bouton **Import (Importer)** en haut de l'écran. Une fenêtre contextuelle s'affiche. Accéder au fichier *3500xL import file (fichier d'importation de 3500xL)* (le fichier ABI) créé par le logiciel LeukoStrat CDx FLT3. Cliquer sur **OPEN (OUVRIER)** dans la fenêtre contextuelle, puis cliquer sur **OK** dans la fenêtre contextuelle de confirmation de l'importation.
- 10.16.9.1. S'il n'existe aucun fichier correspondant dans la bibliothèque de l'analyseur 3500xL pour le nom du test dans le fichier ABI, cliquer sur **Proceed (Continuer)** dans la fenêtre contextuelle qui s'affiche :



- 10.16.10. Cliquer sur **OK** dans la fenêtre contextuelle suivante.



- 10.16.11. Lorsque l'importation est terminée, les identifiants des échantillons remplissent le plan de plaque à l'écran. Vérifier que le plan de plaque à l'écran est correct en passant en revue les identifiants des échantillons à l'écran. Si les échantillons ne correspondent pas à la configuration prévue, un nouveau fichier ABI doit être créé dans le logiciel LeukoStrat CDx FLT3 et réimporté dans l'analyseur ABI 3500xL.
- 10.16.12. Confirmer les tests programmés dans l'analyseur 3500xL en utilisant les paramètres indiqués au Tableau 6 pour le test ITD CDx ou le test TKD CDx.
- 10.16.13. Attribuer les paramètres *Assay (Test)*, *Results Group (Groupe de résultats)* et *File Name Convention (Convention de nom de fichier)* à tous les puits contenant des échantillons et des contrôles, le cas échéant.

REMARQUE : Le paramètre *File Name Convention (Convention de nom de fichier)* doit avoir comme premier attribut le paramètre *Sample Name (Nom de l'échantillon)*.

- 10.16.14. Charger la ou les plaques sur l'analyseur 3500xL.
- 10.16.15. Cliquer sur **Link Plate for Run (Lier la plaque pour le programme)**. S'il y est invité, l'opérateur peut enregistrer les modifications apportées à la plaque. Si une seconde plaque doit être analysée, répéter les étapes 10.16.2 à 10.16.14.

10.17. Lancement de l'analyseur génétique 3500xL

- 10.17.1. Vérifier l'absence de bulles dans la tubulure du polymère POP-7. Les éliminer le cas échéant.
- 10.17.2. Cliquer sur **Start Run (Lancer le programme)** pour lancer le programme sur l'analyseur 3500xL.
- 10.17.3. Lorsque le programme est terminé, retirer et jeter le septum ainsi que la plaque d'électrophorèse capillaire.

10.18. Analyse des données avec le logiciel GeneMapper

REMARQUE : Ne pas ignorer une erreur de marqueur de taille pour un puits dans le logiciel GeneMapper.

- 10.18.1. Ouvrir le logiciel *GeneMapper v4.1.x*.
- 10.18.2. Dans *File Menu (Menu Fichier)*, sélectionner New Project (Nouveau projet), puis Microsatellite (Microsatellite). Cliquer sur OK. Revenir à *File Menu (Menu Fichier)* et sélectionner Add Samples to Project (Ajouter des échantillons au projet).
- 10.18.3. Dans le volet de gauche, accéder aux fichiers de données dans le dossier de données de l'analyseur 3500xL (désigné par *Results Group [Groupe de résultats]*) et cliquer sur **Add to List (Ajouter à la liste)** pour les transférer vers le volet de droite. Cliquer sur le bouton **Add (Ajouter)** ou **Add & Analyze (Ajouter et analyser)**.
- 10.18.4. S'assurer que le paramètre Analysis Method (Méthode d'analyse) est défini sur Microsatellite (Microsatellite) et que le paramètre Size Standard (Marqueur de taille) est défini sur GS600LIZ+Normalization (GS600 LIZ + Normalisation) pour tous les échantillons.

REMARQUE : Si plusieurs types de test se trouvent sur une plaque, les options *Analysis Method (Méthode d'analyse)* et *Size Standard (Marqueur de taille)* peuvent être configurées par injection afin de faciliter le flux de travail. L'option *Injections (Injections)* peut être sélectionnée dans la fenêtre *Project (Projet)*.

- 10.18.5. Configurer le paramètre *Analysis Method (Méthode d'analyse)* selon les indications de la Figure 3.
 - 10.18.5.1. Cliquer sur Analysis (Analyse), puis sur Analysis Method Editor (Éditeur de la méthode d'analyse) dans le menu situé en haut de l'écran.
 - 10.18.5.2. Dans l'onglet *Peak Detector (Déecteur des pics)*, s'assurer que **Peak Detection Algorithm (Algorithme de détection des pics)** est défini sur *Advanced (Avancé)*.
 - 10.18.5.3. Dans *Peak Amplitude Thresholds (Seuils d'amplitude des pics)*, s'assurer que la valeur 100 soit saisie pour les canaux des fluorophores B (blue/bleu) et G (green/vert) et 50 pour les autres canaux des fluorophores Y (yellow/jaune), R (red/rouge), P (purple/violet) et O (orange/orange). Les canaux des fluorophores jaune et violet ne sont pas utilisés dans le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
 - 10.18.5.4. S'assurer que *Polynomial Degree (Degré du polynôme)* est défini sur 3 pour le test ITD et sur 5 pour le test TKD.
 - 10.18.5.5. Cliquer sur **OK** en bas de la fenêtre.

REMARQUE : Des méthodes d'analyse spécifiques aux tests ITD et TKD peuvent être configurées et utilisées dans GeneMapper en allant dans *Tools (Outils)* et en sélectionnant **GeneMapper Manager (Gestionnaire GeneMapper)**. Dans l'onglet *Analysis Methods (Méthodes d'analyse)*, cliquer sur le bouton **New... (Nouveau...)** et sélectionner **Microsatellite (Microsatellite)** comme type d'analyse. Cliquer sur **OK (OK)**. Saisir un nom, une description et un instrument dans *Name (Nom)*, *Description (Description)* et *Instrument (Instrument)* respectivement dans l'onglet *General (Généralités)*, configurer l'onglet *Peak Detector (Déecteur de pics)* comme décrit ci-dessus et dans la Figure 3, et laisser les valeurs dans les onglets *Allele (Allèle)*, *Peak Quality (Qualité des pics)* et *Quality Flags (Indicateurs de qualité)* définies sur les valeurs par défaut correspondant à *Microsatellite (Microsatellite)*. Sélectionner **Done (Terminé)** et la nouvelle option sous *Analysis Method (Méthode d'analyse)* peut être sélectionnée.

- 10.18.1. Cliquer sur le bouton vert **play (démarrer)** pour lancer l'analyse. Une invite s'affiche, demandant à enregistrer le fichier. Enregistrer le projet GeneMapper sous un nom approprié. Le nom du chemin du fichier doit contenir 256 caractères maximum.
- 10.18.2. Dans le logiciel GeneMapper, sélectionner les échantillons et les contrôles à analyser et cliquer sur le bouton **Display Plots (Afficher les graphiques)**. S'assurer que l'icône *Sizing Table (Tableau des tailles)* est sélectionnée et que les fluorophores bleu, vert et rouge sont sélectionnés dans la fenêtre *Samples Plot (Graphique des échantillons)*.

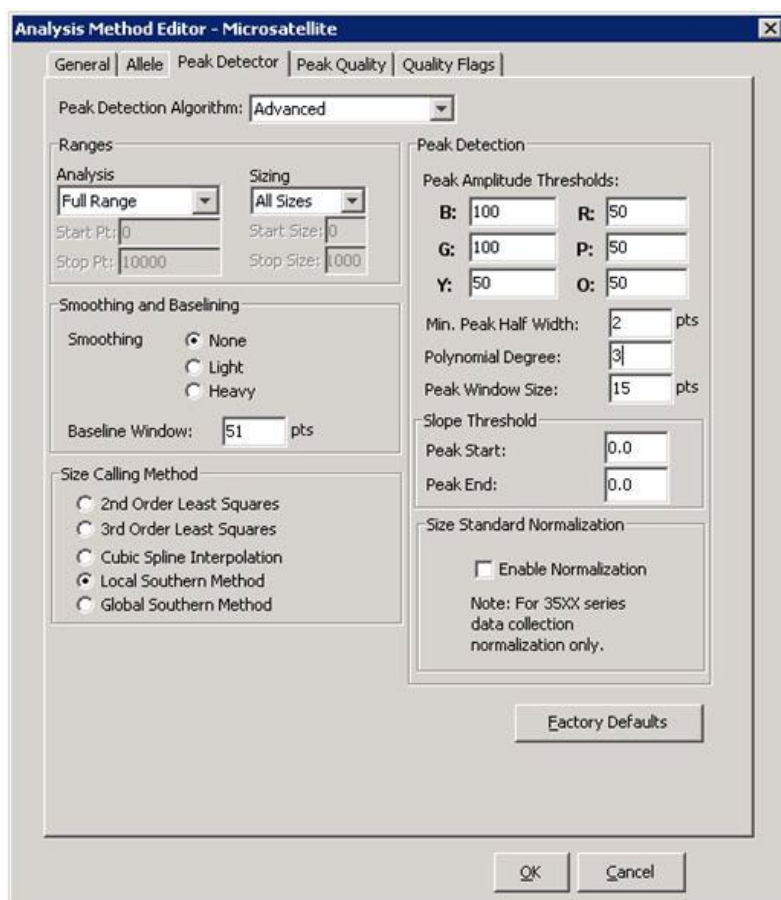
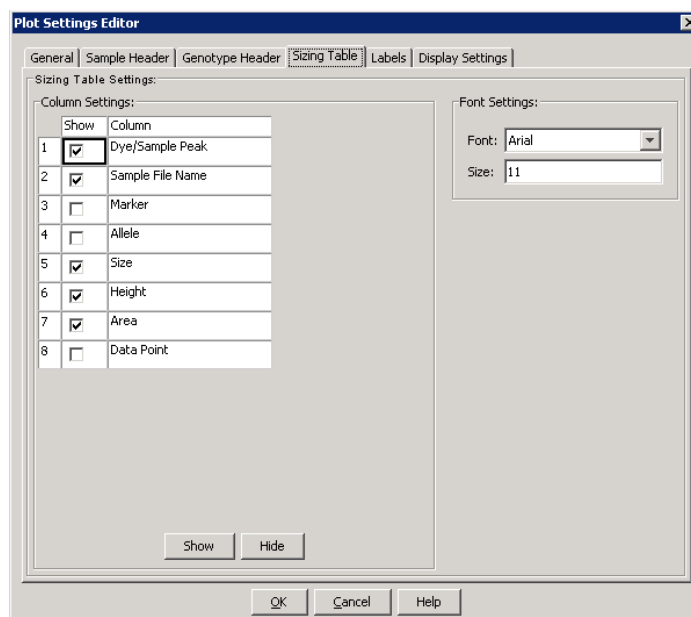


Figure 3 : Paramètres du protocole pour la détermination de la taille des fragments pour le test ITD. Pour le test TKD, les paramètres sont les mêmes, sauf que *Polynomial Degree (Degré du polynôme)* est défini sur 5.

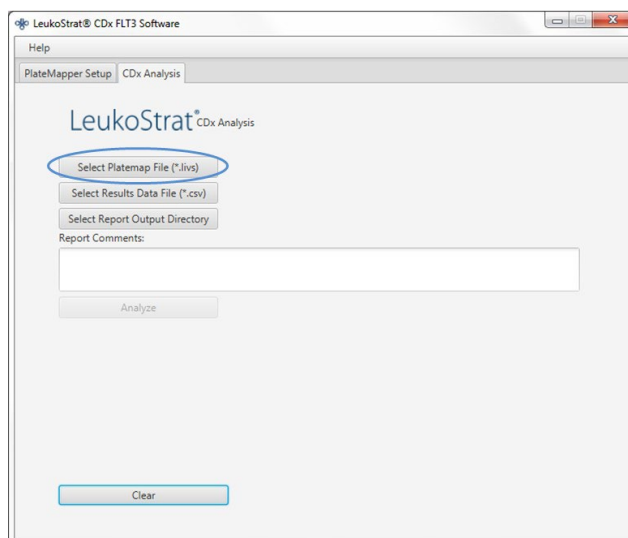
- 10.18.3. S'assurer que le tableau se trouvant en dessous de l'électrophérogramme contient les colonnes suivantes : Dye/Sample Peak (Pic du fluorophore/de l'échantillon), Sample File Name (Nom de fichier de l'échantillon), Size (Taille), Height (Hauteur) et Area (Aire). Si ce n'est pas le cas, sélectionner **Tools (Outils)**, puis **Plot Settings... (Paramètres du graphique...)** dans le menu Samples Plot (Graphique des échantillons). Sélectionner l'onglet Sizing Table (Tableau des tailles) et veiller à ce que les éléments suivants soient cochés (coche verte) dans la colonne Show (Afficher) : Dye/Sample Peak (Pic du fluorophore/de l'échantillon), Sample File Name (Nom de fichier de l'échantillon), Size (Taille), Height (Hauteur) et Area (Aire). Cliquer sur **OK**.



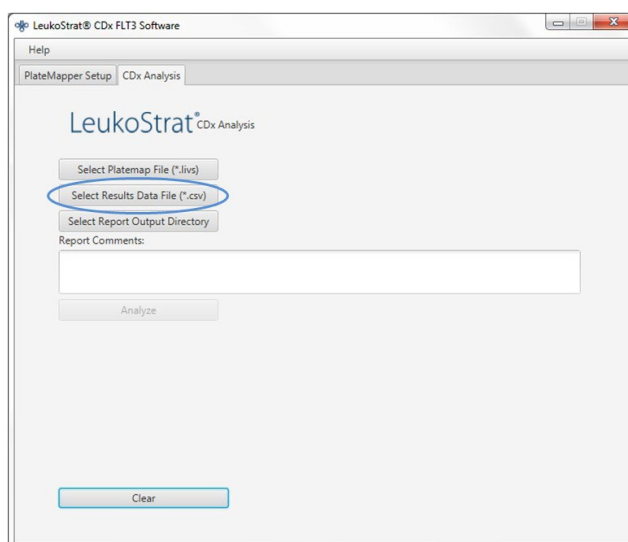
- 10.18.4. Pour exporter les informations du tableau des tailles, sélectionner **File (Fichier)**, puis **Export Table (Exporter le tableau)** dans le menu *Samples Plot (Graphique des échantillons)*. Saisir un nom de fichier et sélectionner l'emplacement où enregistrer le fichier. Dans le menu déroulant *Export File As (Exporter le fichier sous)*, sélectionner **Comma-separated values (.csv) (Valeurs séparées par des virgules [.csv])**. Dans le menu déroulant *Files of type (Fichiers de type)*, sélectionner également le format **Comma-separated values (.csv) (Valeurs séparées par des virgules [.csv])** si possible. Cliquer sur **Export (Exporter)**.

10.19. Analyse des données avec le logiciel LeukoStrat CDx FLT3

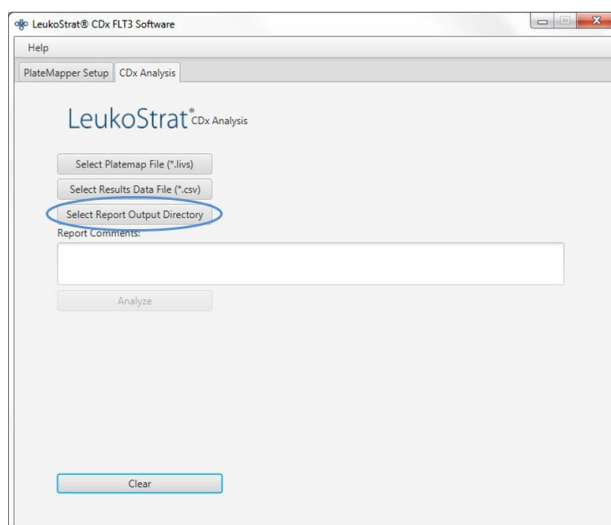
- 10.19.1. Ouvrir le logiciel LeukoStrat CDx FLT3, accepter le contrat de licence et cliquer sur l'onglet *CDx Analysis (Analyse CDx)* du logiciel LeukoStrat CDx FLT3. Cliquer sur **Select Platemap File (*.lvs) (Sélectionner le fichier du plan de plaque [*.lvs])** et accéder au fichier LIVS généré dans l'onglet *PlateMapper Setup (Configuration de PlateMapper)*.



- 10.19.2. Cliquer sur **Select Results Data File (*.csv) (Sélectionner le fichier de données des résultats [*.csv])** et sélectionner un fichier CSV exporté dans l'étape 10.18.4 pour analyse.



- 10.19.3. Cliquer sur **Select Results Output Directory** (Sélectionner le répertoire de sortie des résultats) et choisir un dossier de destination pour les résultats.

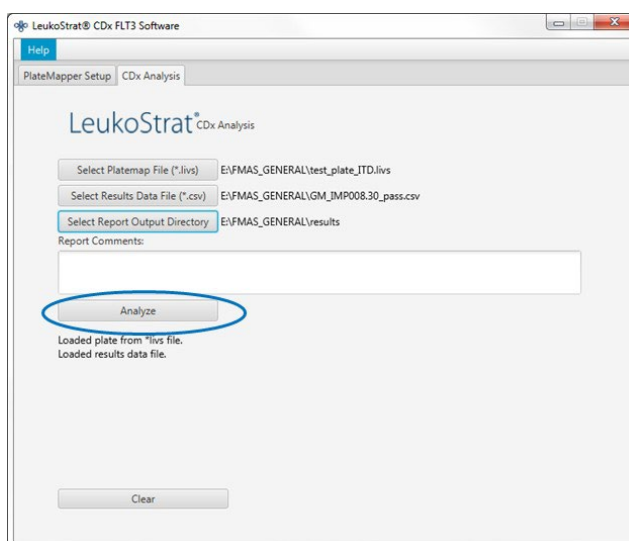


- 10.19.3.1. Des commentaires supplémentaires sur le programme, les échantillons ou les contrôles peuvent être saisis dans le champ *Report Comments* (Commentaires sur le compte-rendu). Ces commentaires apparaîtront dans le rapport intitulé *Run Report* (Compte-rendu du programme).

REMARQUE : Une fois tous les fichiers sélectionnés, ne pas créer ou importer un nouveau *plan de plaque* dans l'onglet *PlateMapper Setup* (Configuration de PlateMapper) avant de procéder à l'analyse du programme actuel/des données. Les modifications apportées dans l'onglet *PlateMapper Setup* (Configuration de PlateMapper) avant de sélectionner le bouton **Analyze (Analyser)** afficheront le rapport avec le mauvais nom de plaque dans *Plate Name* (Nom de la plaque).

- 10.19.4. Lorsque les trois fichiers sont sélectionnés, le bouton **Analyze (Analyser)** devient actif et peut donc être sélectionné. Cliquer sur **Analyze (Analyser)** et trois types de rapports sont générés dans le dossier de destination : un *rapport de type run_report* (compte-rendu du programme) au format PDF, un ou plusieurs *rapports de type sample_report* (compte-rendu sur l'échantillon) au format PDF et un *fichier de type run_export_file* (fichier d'exportation du programme) au format CSV (voir Figure 4, Figure 5 et Figure 6).

- Le rapport intitulé *Run Report* (Compte-rendu du programme) contiendra un résumé des résultats de tous les contrôles et échantillons. Le rapport intitulé *Sample Report* (Compte-rendu de l'échantillon) contiendra les résultats des contrôles ainsi que le détail des résultats de l'échantillon. Le *fichier de type run_export_file* (fichier d'exportation du programme) au format CSV contiendra tous les résultats de du programme dans un format de type feuille de calcul. Les identifiants dans les rapports du logiciel LeukoStrat CDx FLT3 correspondent aux 12 derniers caractères de l'identifiant généré par le logiciel.



LeukoStrat® CDx FLT3 Software

Run Report:

Run Information			
Run ID	fb170062-996c-4859-90c7-000000000001		
Plate ID	9dd67e4f-d8d0-4016-b72c-f7179eaae829	Assay	ITD
Plate Barcode	01234	Analysis Date	2022-12-02 10:49:49 AM
Plate Name	UnitTestPlate	Run Pass/Fail	Pass

Controls				
Type	Name	ID	Pass/Fail	Fail Detail
PC	PCControl1_ITD_PC_H01	08277bd1d8e5	Pass	
NTC	NTCControl1_ITD_NTC_F01	4a6bf004cd22	Pass	
EC	ExtractionControl1_ITD_EC_E01	4e614e4d9b70	Pass	

Samples				
Sample Name	EC ID	Pos/Neg/Fail	Signal Ratio	Fail Detail
SampleA01_ITD_SAMPLE_A01	4e614e4d9b70	Positive	0.09	
SampleA02_ITD_SAMPLE_A02	4e614e4d9b70	Positive	0.07	
SampleA03_ITD_SAMPLE_A03	4e614e4d9b70	Positive	0.11	
SampleA04_ITD_SAMPLE_A04*	4e614e4d9b70	Negative	0.00	
SampleA05_ITD_SAMPLE_A05	4e614e4d9b70	Negative	0.00	
SampleA06_ITD_SAMPLE_A06	4e614e4d9b70	Negative	0.00	
SampleA07_ITD_SAMPLE_A07	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91
SampleA08_ITD_SAMPLE_A08	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91
SampleA09_ITD_SAMPLE_A09	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91
SampleA10_ITD_SAMPLE_A10	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91
SampleA11_ITD_SAMPLE_A11	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91

Report Comments
N/A

* Indicates additional notes on Sample Report

Figure 4. Exemple de rapport d'un programme intitulé *Run Report* (Compte-rendu du programme).

LeukoStrat® CDx FLT3 Software

Sample Report:

Sample and Run Information			
Sample Name	SampleA01_ITD_SAMPLE_A01		
Sample ID	21c1a415-6fad-4f69-af8e-535ad212c275		
Plate ID	9dd67e4f-d8d0-4016-b72c-f7179eaae829	Assay	ITD
Plate Barcode	01234	Analysis Date	2022-12-02 10:49:49 AM
Plate Name	UnitTestPlate		
Run ID	fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	Sample Pos/Neg/Fail	Positive

Controls				
Type	Name	ID	Pass/Fail	Fail Detail
PC	PControl1_ITD_PC_H01	08277bd1d8e5	Pass	
NTC	NTCControl1_ITD_NTC_F01	4a6bf004cd22	Pass	
EC	ExtractionControl1_ITD_EC_E01	4e614e4d9b70	Pass	

Sample				
Sample Name	EC ID	Pos/Neg/Fail	Signal Ratio	Fail Detail
SampleA01_ITD_SAMPLE_A01	4e614e4d9b70	Positive	0.09	

Sample Notes	
N/A	

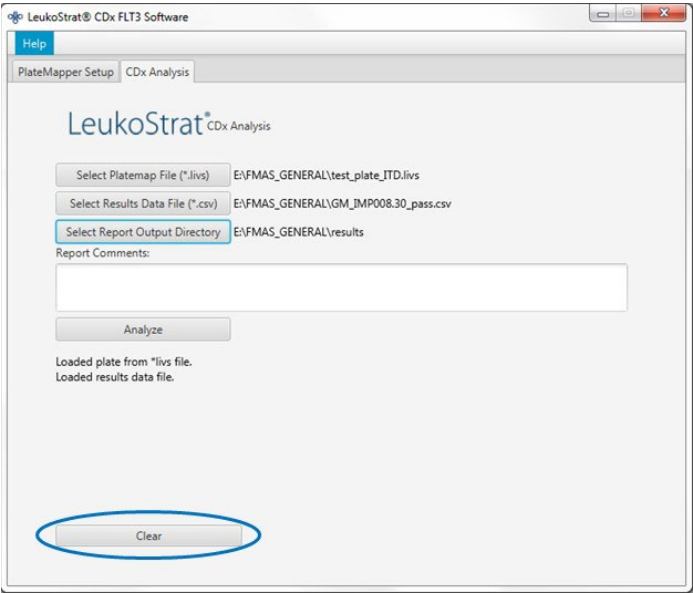
Report Comments	
N/A	

Figure 5. Exemple de rapport d'un échantillon intitulé *Sample Report* (Compte-rendu de l'échantillon).

Run ID	Assay	Run Result	Sample ID	Sample Type	EC ID	Sample Name	Sample Result	Signal Ratio	Sample Notes	Software Version
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	f7abf689-888c-4942-8202-08277bd1d8e5	PC		PControl1_ITD_PC_H01	POS	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	323e17c2-c7bf-4d57-9c86-4a6bf004cd22	NTC		NTCCControl1_ITD_NTC_F01	UNSET	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	EC	08b5ee54-77a5-4159-a028-11f364c3c963	ExtractionControl1_ITD_EC_E01	NEG	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	21c1a415-6fad-4f69-a88e-535ad212c275	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA01_ITD_SAMPLE_A01	POS	0.09		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	29533bfb-b916-48c9-8ec1-e74444ca2be5	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA02_ITD_SAMPLE_A02	POS	0.07		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	5a6a01c9-d38d-48ea-a433-ea347e01b72b	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA03_ITD_SAMPLE_A03	POS	0.11		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	76a3ae2d-417d-4690-92f6-55521e593a6f	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA04_ITD_SAMPLE_A04	NEG	0	Validation Sample Note	v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	dd33cd5b-aa6f-473b-8565-386398d84912	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA05_ITD_SAMPLE_A05	NEG	0		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	8cf778b8-0353-49c7-bf93-cf842fc77b3a	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA06_ITD_SAMPLE_A06	NEG	0		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	55265e37-070c-4e9d-a418-95d07099dbb	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA07_ITD_SAMPLE_A07	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	d3c89c59-d882-4c39-8504-23153e174140	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA08_ITD_SAMPLE_A08	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	b19bcd10-092c-47e1-bed1-fc0e30ed3dcf	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA09_ITD_SAMPLE_A09	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	ac125670-78fe-42df-ab0e-1acae7f4a9c2	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA10_ITD_SAMPLE_A10	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	7a3b21f1-c898-424a-bb66-72c79c6c5c13	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA11_ITD_SAMPLE_A11	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD

Figure 6. Exemple de fichier de type run_export_file (fichier d'exportation du programme) au format CSV

10.19.5. Cliquer sur **Clear (Effacer)** pour effacer le contenu de tous les champs.



10.19.6. Si aucun résultat n'est obtenu, vérifier que toutes les étapes ont été correctement complétées. Pour résoudre les erreurs liées aux résultats des données, consulter le Tableau 9. Pour toute assistance supplémentaire, veuillez contacter le support technique Invivoscribe à l'adresse électronique support@invivoscribe.com.

Tableau 9 : Messages d'erreur liés aux résultats des données et actions correctives

Message d'erreur lié au téléchargement des résultats des données	Cause(s) probable(s)	Action(s) corrective(s)
-Unrecognized dye: <dye letter> [AD01] (Fluorophore non reconnu : <lettre du fluorophore>.)	Fluorophores non utilisés sélectionnés pendant l'étape d'analyse sur GeneMapper.	Pour l'analyse, sélectionner R,G,B.
-No red dye detected. Please make sure red dye is selected during previous signal analysis step. [AD02] (Aucun fluorophore rouge détecté. S'assurer que le fluorophore rouge est sélectionné pendant l'étape précédente d'analyse du signal.)	Le fluorophore rouge n'a pas été sélectionné pendant l'étape d'analyse sur GeneMapper.	S'assurer de sélectionner le fluorophore rouge pendant l'étape d'analyse sur GeneMapper.
-Unrecognized data results file format. [AD03] (Format du fichier de données des résultats non reconnu.)	Le fichier de GeneMapper est corrompu.	N'apporter aucune modification, quelle qu'elle soit, au fichier de GeneMapper.
-Unable to load LVS platemap file; incorrect format. [AD04] (Impossible de charger le <i>fichier du plan de plaque</i> LVS, format incorrect.)	Le fichier LVS est corrompu.	N'apporter aucune modification, quelle qu'elle soit, au fichier LVS.

Tableau 9 : Messages d'erreur liés aux résultats des données et actions correctives

Message d'erreur lié au téléchargement des résultats des données	Cause(s) probable(s)	Action(s) corrective(s)
-Did not find run for runId <runId> [AD05] (Programme pour l'identifiant de programme <identifiant du programme> introuvable.) -Did not find sample for sample name <sampleName> [AD06] (Échantillon pour le nom d'échantillon <nom de l'échantillon> introuvable.)	Fichier LVS sélectionné incorrect ou le fichier LVS est corrompu.	S'assurer de sélectionner le bon fichier LVS associé au test analysé.
-General error loading results data file; please contact technical support. [AD07] (Erreur générale lors du chargement du fichier de données des résultats; contacter le support technique.)	Une erreur inconnue s'est produite.	Contacter le support technique.
-String index out of range: -1 (Index de chaîne hors plage : -1.)	<Sample Name> (<Nom de l'échantillon>) n'était pas le premier attribut sélectionné lors de la configuration de la convention de nom de fichier (étape 10.15.7).	Répéter le programme en commençant à l'étape 10.12. <i>Détection par électrophorèse capillaire</i> avec la bonne convention de nom de fichier.
-String index out of range: 15 (Index de chaîne hors plage : 15.)	Le fichier de résultats au format CSV a été modifié.	Répéter l'exportation du fichier de résultats au format CSV depuis le logiciel de recueil des données. N'apporter aucune modification, quelle qu'elle soit, au fichier au format CSV.

11. Contrôle qualité

11.1. Validité du programme

- 11.1.1. Le logiciel LeukoStrat CDx *FLT3* évalue automatiquement les résultats.
- 11.1.2. Si le statut de l'analyse est *Fail (Échec)*, tous les résultats de test au sein de la même analyse ne sont pas valides. Selon le code indiqué dans la colonne *Fail Detail (Code d'échec)* du rapport, l'analyse doit être répétée à partir de différents points de départ au sein du test (voir section 13 *Répétition des tests*).

11.2. Validité du contrôle d'extraction et des échantillons

- 11.2.1. Au sein d'une analyse valide, il est possible que des échantillons individuels ne soient pas valides (*Fail [Échec]*). Si un contrôle d'extraction ne répond pas aux critères de validité, tous les échantillons associés à ce contrôle d'extraction porteront la mention *Fail (Échec)*.
- 11.2.2. Les échantillons pour lesquels tous les contrôles sont valides peuvent échouer si, individuellement, ils ne répondent pas aux spécifications. Selon le code indiqué dans la colonne *Fail Detail (Code d'échec)* du rapport du logiciel LeukoStrat CDx *FLT3*, le ou les échantillons doivent être répétés à partir de différents points de départ au sein du test (voir section 13 *Répétition des tests*).

REMARQUE : S'il se produit plusieurs échecs avec le même type de code (Fail Detail [Code d'échec]) lors d'une analyse, la stratégie de répétition des tests est différente de celle d'un échec pour un contrôle ou un échantillon isolé (voir section 13 *Répétition des tests*).

12. Interprétation des résultats

- 12.1. Les patients atteints de LAM porteurs d'une mutation de *FLT3* de type ITD or TKD détectable qui atteint ou dépasse le seuil clinique sont candidats à un traitement par midostaurine ou fumarate de gilteritinib.
- 12.2. Le rapport des signaux muté/sauvage est calculé par le logiciel LeukoStrat CDx *FLT3* et est évalué automatiquement par rapport au seuil clinique (point de décision médicale) de **0,05**. Le rapport des signaux correspond à l'aire du pic du signal muté, si présent, divisée par l'aire du pic du signal sauvage, si présent. Le rapport des signaux muté/sauvage s'affiche avec deux décimales.
- 12.3. Il convient de noter que les mutations ITD peuvent comporter plusieurs mutations ; les aires des pics des mutations sont additionnées pour calculer le signal muté total. En outre, il est possible qu'un échantillon ne contienne aucun signal sauvage (100 % muté). Dans ce cas, le rapport des signaux muté/sauvage est rapporté par le logiciel LeukoStrat CDx *FLT3* comme étant de **100** ; ceci n'exprime pas une valeur du rapport.
- 12.4. Si le rapport des signaux muté/sauvage, pour le test ITD ou le test TKD, dans un résultat d'échantillon valide est égal ou supérieur au seuil clinique de 0,05, le résultat sera interprété et rapporté comme étant **Positive (Positif)** ; dans ce cas, la midostaurine ou fumarate de gilteritinib est indiquée.
- 12.5. Si les rapports des signaux muté/sauvage, à la fois pour le test ITD et le test TKD, dans un résultat d'échantillon valide sont inférieurs au seuil clinique de 0,05, le résultat sera interprété et rapporté comme étant **Negative (Négatif)** ; dans ce cas, la midostaurine ou fumarate de gilteritinib n'est pas indiquée.
- 12.6. Le statut mutationnel d'un échantillon est défini par les règles présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Détermination du statut mutationnel des échantillons

Scénario	Résultat du logiciel pour ITD	Rapport des signaux pour ITD	Résultat du logiciel pour TKD	Rapport des signaux pour TKD	Résultat final du test
1	Positive (Positif)	$\geq 0,05$	Positive (Positif)	$\geq 0,05$	Positive (Positif)
2	Negative (Négatif)*	$< 0,05$	Negative (Négatif)**	$< 0,05$	Negative (Négatif)
3	Invalid (Non valide)	S.O.	Invalid (Non valide)	S.O.	Invalid (Non valide)
4	Positive (Positif)	$\geq 0,05$	Negative (Négatif)**	$< 0,05$	Positive (Positif)
5	Negative (Négatif)*	$< 0,05$	Positive (Positif)	$\geq 0,05$	Positive (Positif)
6	Positive (Positif)	$\geq 0,05$	Invalid (Non valide)	S.O.	Positive (Positif)
7	Negative (Négatif)*	$< 0,05$	Invalid (Non valide)	S.O.	Invalid (Non valide)
8	Invalid (Non valide)	S.O.	Positive (Positif)	$\geq 0,05$	Positive (Positif)
9	Invalid (Non valide)	S.O.	Negative (Négatif)**	$< 0,05$	Invalid (Non valide)

* Les rapports des signaux pour ITD $\geq 0,01$ et inférieurs à 0,05 représentent de réelles mutations, mais ils se situent en-dessous du seuil clinique.

** Les rapports des signaux pour TKD $\geq 0,03$ et inférieurs à 0,05 représentent de réelles mutations, mais ils se situent en-dessous du seuil clinique.

- 12.7. Les codes d'échec sont fournis dans le rapport du logiciel LeukoStrat CDx *FLT3* ; répéter l'analyse ou tester de nouveau les échantillons conformément aux instructions de la section 13.4.
- 12.8. Si l'appareil ne fonctionne pas comme prévu ou si les résultats de test ne sont pas interprétés correctement, il est possible que les résultats des mutations de *FLT3* soient erronés, pouvant ainsi conduire à de mauvaises décisions quant à la prise en charge des patients en termes de traitement de leur LAM.
- 12.8.1. Un résultat de test faux négatif pourrait avoir pour conséquence qu'un patient atteint de LAM ne bénéficiera pas des effets bénéfiques potentiels pouvant être associés au traitement par midostaurine (RYDAPT®). Cependant, le patient recevra une chimiothérapie intensive en traitement standard pour une LAM nouvellement diagnostiquée.
- 12.8.2. Les patients ayant un résultat de test faux positif pourront recevoir le traitement par RYDAPT (midostaurine) pour lequel aucun effet bénéfique n'est attendu. Pour plus d'informations sur les effets indésirables liés au traitement par midostaurine, se reporter à la notice de RYDAPT, médicament fabriqué par Novartis AG.

13. Répétition des tests

13.1. Programmes non valides

- 13.1.1. Une analyse non valide est une analyse dans laquelle le contrôle positif et/ou le contrôle sans matrice ne répondent pas aux critères de validité. Répéter l'analyse en incluant tous les échantillons, le contrôle positif, tous les contrôles d'extraction associés et le contrôle sans matrice. Les analyses ITD et TKD sont indépendantes les unes des autres.
- 13.1.2. Répéter l'analyse en suivant le Tableau 11 ou le Tableau 12, en fonction du test et du ou des codes d'échec spécifiques indiqués dans la section *Controls (Contrôles)* des rapports du logiciel LeukoStrat CDx FLT3. Le ou les codes d'échec indiqués pour le contrôle positif ou le contrôle sans matrice ayant échoué remplacent et annulent tous les codes d'échec du contrôle d'extraction et des échantillons.

13.2. Contrôle d'extraction non valide au sein de programmes valides

- 13.2.1. Pour les échecs du contrôle d'extraction au sein d'une analyse valide pouvant contenir plusieurs contrôles d'extraction, tester de nouveau tous les contrôles d'extraction ayant échoué, les échantillons associés, le contrôle positif ainsi que le contrôle sans matrice pour l'analyse ITD ou TKD appropriée. Répéter les tests en suivant le Tableau 11 ou le Tableau 12, en fonction du test et du ou des codes d'échec spécifiques indiqués dans la section *Controls (Contrôles)* des rapports du logiciel LeukoStrat CDx FLT3. Le ou les codes d'échec indiqués pour le contrôle d'extraction ayant échoué remplacent et annulent tous les codes d'échec des échantillons.

13.3. Échantillons non valides au sein de programmes valides

- 13.3.1. Pour les échecs d'échantillons au sein d'une analyse valide, tester de nouveau le ou les échantillons, le contrôle positif, le ou les contrôles d'extraction associés à ou aux échantillons ayant échoué ainsi que le contrôle sans matrice pour l'analyse ITD ou TKD appropriée. Répéter les tests en suivant le Tableau 11 ou le Tableau 12, en fonction du test et du ou des codes d'échec spécifiques indiqués dans la section *Samples (Échantillons)* des rapports du logiciel LeukoStrat CDx FLT3. Tester de nouveau un échantillon implique de tester de nouveau le contrôle d'extraction associé.

13.4. Codes d'échec et répétition des tests

- 13.4.1. Le Tableau 11 et le Tableau 12 résument la procédure de répétition des tests en fonction du code d'échec par type d'échantillon pour les tests ITD et TKD, respectivement. Consulter le Tableau 13 pour les codes de répétition des tests indiqués dans le Tableau 11 et le Tableau 12.
- 13.4.2. La hiérarchie de répétition des tests est la suivante :

- 1) Contrôle positif (PC) ou contrôle sans matrice (NTC) du test ITD ou du test TKD non valide (voir section 13.1)
- 2) Contrôle d'extraction (EC) non valide au sein d'une analyse valide (voir section 13.2)
- 3) Échantillons non valides au sein d'une analyse valide (voir section 13.3)

La Figure 7 présente un schéma de la hiérarchie de répétition des tests.

- 13.4.3. Si plus d'un échec s'est produit au sein d'un seul échantillon ou contrôle, effectuer la répétition des tests à partir de l'étape la plus proche du début de la procédure de test.
 - 13.4.3.1. Si le même code d'échec apparaît pour le même contrôle/échantillon, recommencer au point de départ de la répétition des tests suivant, s'il y en a un d'indiqué. Si le même code d'échec apparaît à nouveau après avoir entrepris toutes les actions de résolution des problèmes, le résultat du contrôle/de l'échantillon n'est pas valide.
 - 13.4.3.2. Si les résultats de la répétition des tests présentent un code d'échec différent de celui des résultats initiaux, appliquer l'action de résolution des problèmes décrite pour le nouveau code d'échec de répétition des tests.

REMARQUE : Un même contrôle/échantillon ne peut être retesté que quatre fois maximum.

- 13.4.4. Les échantillons non valides sont évalués indépendamment ; ainsi, si plusieurs échantillons ayant des codes d'échec différents pour chaque échantillon sont identifiés au sein d'une même analyse, effectuer la procédure de répétition des tests appropriée à chaque échantillon.

REMARQUE : Pour toute assistance supplémentaire, veuillez contacter le support technique Invivoscribe à l'adresse électronique support@invivoscribe.com.

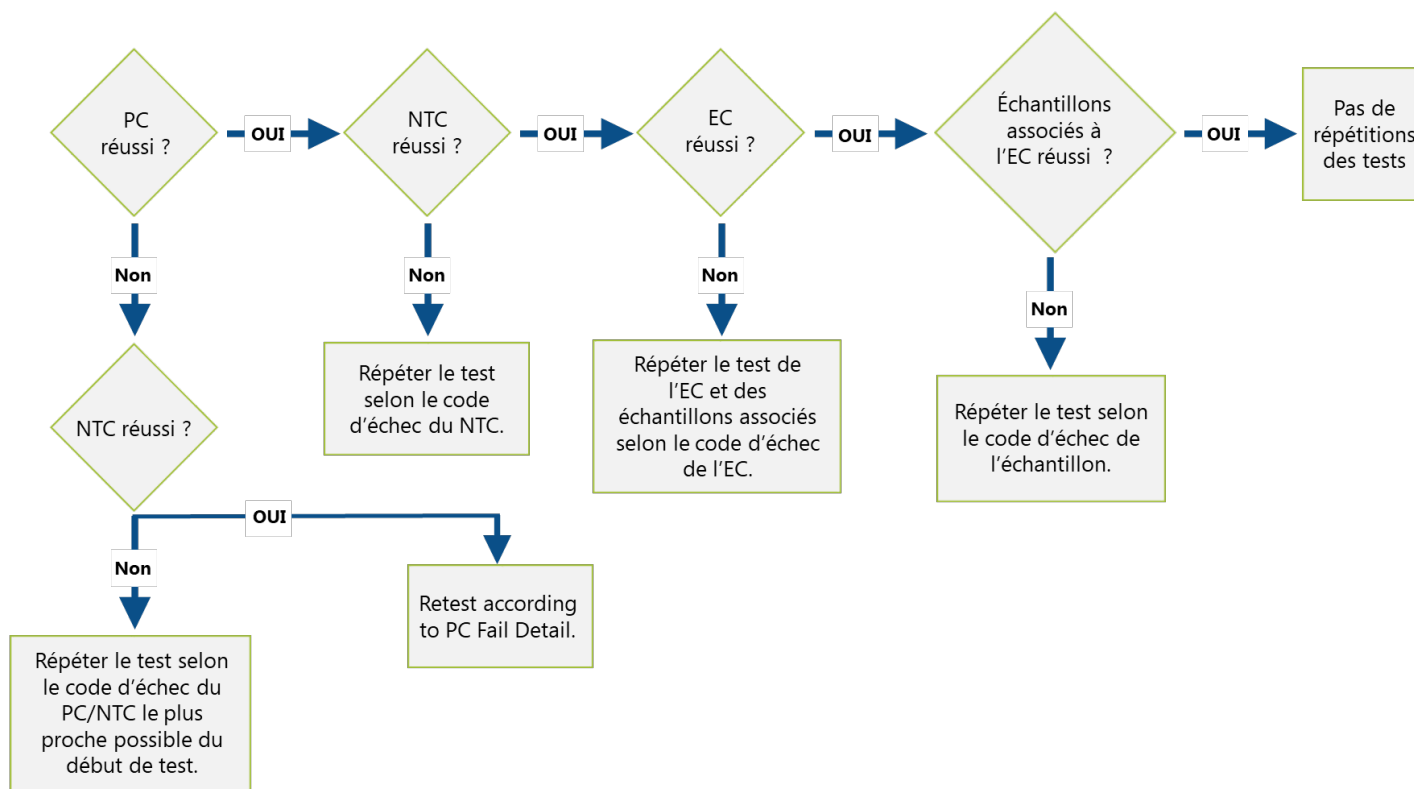


Figure 7. Schéma de la hiérarchie de répétition des tests

Tableau 11 : Répétition des tests, contrôles et échantillons pour le test ITD

Code d'échec pour le test ITD	Contrôles			Échantillons	
	PC	NTC	EC	Échantillon pos.	Échantillon nég.
IR05: Sample or Control Failed. (Échec de l'échantillon ou du contrôle.)	Amp		Amp		Quant/Proc
IR06: Sample or Control Failed. (Échec de l'échantillon ou du contrôle.)	Amp				Quant/Proc
IR07: Sample Failed. (Échec de l'échantillon.)				CE-DS	CE-DS
IR09: Sample or Control Failed. (Échec de l'échantillon ou du contrôle.)	CE	CE	CE	CE/Proc	CE/Proc
IR12: Sample or Control Failed. (Échec de l'échantillon ou du contrôle.)	Amp		Q-Amp	Quant/Proc	Quant/Proc
IR13: Control Failed. (Échec du contrôle.)	CE				
IR20: Control Failed. (Échec du contrôle.)				Ctrl	Ctrl
IR21: Control Failed. (Échec du contrôle.)				Ctrl	Ctrl
IR31: Control Failed. (Échec du contrôle.)	Amp				

Tableau 11 : Répétition des tests, contrôles et échantillons pour le test ITD

Code d'échec pour le test ITD	Contrôles			Échantillons	
	PC	NTC	EC	Échantillon pos.	Échantillon nég.
IR32: Control Failed. (Échec du contrôle.)	CE/Amp				
IR33: Control Failed. (Échec du contrôle.)	CE/Amp				
IR34: Control Failed. (Échec du contrôle.)	Amp				
IR40: Control Failed. (Échec du contrôle.)		Amp			
IR51: Control Failed. (Échec du contrôle.)			Q-Amp		
IR52: Control Failed. (Échec du contrôle.)			CE/Q-Amp		
IR53: Control Failed. (Échec du contrôle.)				Ctrl	Ctrl
IR70: Sample Failed. (Échec de l'échantillon.)				CE/Proc	
IR80: Sample Failed. (Échec de l'échantillon.)					Quant/Proc
IR91: Sample or Control Failed. (Échec de l'échantillon ou du contrôle.)	CE	CE	CE	CE	CE

Tableau 12 : Répétition des tests, contrôles et échantillons pour le test TKD

Code d'échec pour le test TKD	Contrôles			Échantillons	
	PC	NTC	EC	Échantillon pos.	Échantillon nég.
TR07: Sample or Control Failed. (Échec de l'échantillon ou du contrôle.)	Dig		Dig		Dig/Proc
TR09: Sample or Control Failed. (Échec de l'échantillon ou du contrôle.)	CE	CE	CE	CE/Proc	CE/Proc
TR12: Sample or Control Failed. (Échec de l'échantillon ou du contrôle.)	Amp		Q-Amp	Quant/Proc	Quant/Proc
TR20: Control Failed. (Échec du contrôle.)				Ctrl	Ctrl
TR21: Control Failed. (Échec du contrôle.)				Ctrl	Ctrl
TR30: Control Failed. (Échec du contrôle.)	Xtalk/Amp				
TR31: Control Failed. (Échec du contrôle.)	CE/Amp				
TR32: Control Failed. (Échec du contrôle.)	CE/Amp				
TR33: Control Failed. (Échec du contrôle.)	Amp				
TR40: Control Failed. (Échec du contrôle.)		Amp			

Tableau 12 : Répétition des tests, contrôles et échantillons pour le test TKD

Code d'échec pour le test TKD	Contrôles			Échantillons	
	PC	NTC	EC	Échantillon pos.	Échantillon nég.
TR50: Control Failed. (Échec du contrôle.)			Xtalk/Q-Amp		
TR51: Control Failed. (Échec du contrôle.)			CE/Q-Amp		
TR52: Control Failed. (Échec du contrôle.)			Dig		
TR53: Control Failed. (Échec du contrôle.)				Ctrl	Ctrl
TR70: Sample Failed. (Échec de l'échantillon.)				Xtalk/Quant/ Proc	
TR71: Sample Failed. (Échec de l'échantillon.)				CE/Proc	
TR72: Sample Failed. (Échec de l'échantillon.)				Dig/Proc	
TR80: Sample Failed. (Échec de l'échantillon.)					Xtalk/Quant/ Proc
TR81: Sample Failed. (Échec de l'échantillon.)					Quant/Proc
TR93: Sample or Control Failed. (Échec de l'échantillon ou du contrôle.)	CE	CE	CE	CE	CE

Tableau 13 : Codes de répétition des tests

Code de répétition des tests	Description	Point de départ de la répétition des tests
Amp	Répéter en commençant à l'amplification, en utilisant les dilutions d'échantillons d'ADN déjà préparées.	10.10. <i>Amplification</i>
CE	Répéter en commençant à l'électrophorèse capillaire. Préparer une nouvelle plaque d'électrophorèse capillaire avec un amplicon frais (provenant de la plaque de PCR ITD ou de la plaque de digestion TKD stockée), en s'assurant que le contrôle positif, le contrôle sans matrice et le ou les contrôles d'extraction associés sont également présents sur la plaque avec l'échantillon ayant échoué. Une répétition des tests causée par des artefacts doit être arrêtée si l'artefact apparaît à la même taille lors de deux programmes consécutifs; sinon, les artefacts de différentes tailles sont considérés comme des codes d'échec uniques.	10.12. <i>Détection par électrophorèse capillaire</i>
CE/Amp CE/Q-Amp	Répéter les tests en suivant les instructions pour le code de répétition des tests CE. Si les résultats des tests répétés donnent le même code d'échec, répéter de nouveau les tests en suivant les instructions pour le code Amp ou Q-Amp, comme indiqué.	10.12. <i>Détection par électrophorèse capillaire</i> 10.9. <i>Quantification et dilution de l'ADN</i> 10.10. <i>Amplification</i>
CE/Proc	Répéter les tests en suivant les instructions pour le code de répétition des tests CE. Si les résultats des tests répétés donnent le même code d'échec, retraiter l'échantillon en commençant à partir du sang périphérique ou de l'aspiration de moelle osseuse.	10.12. <i>Détection par électrophorèse capillaire</i> 10.2. <i>Préparation en vue du traitement des échantillons</i>
CE-DS	Répéter en commençant à l'électrophorèse capillaire. Préparer une nouvelle plaque d'électrophorèse capillaire avec un amplicon frais (provenant de la plaque de PCR ITD stockée), en s'assurant que le contrôle positif, le contrôle sans matrice et le ou les contrôles d'extraction associés sont également présents sur la plaque. Si, après la répétition des tests, le même code d'échec (IR07) apparaît, le résultat de l'échantillon est valide et peut être transmis (voir section 13.6. <i>Déplacement du fluorophore</i>).	10.12. <i>Détection par électrophorèse capillaire</i>

Tableau 13 : Codes de répétition des tests

Code de répétition des tests	Description	Point de départ de la répétition des tests
Ctrl	Répéter en suivant les instructions pour le contrôle qui a échoué.	Varie
Dig	Répéter en commençant à la digestion, en utilisant un amplicon frais (provenant de la plaque de PCR TKD stockée) du ou des échantillons, le ou les contrôles d'extraction associés et les contrôles.	10.11. <i>Digestion par enzyme de restriction (mutation TKD uniquement)</i>
Dig/Proc	Répéter les tests en suivant les instructions pour le code de répétition des tests Dig. Si les résultats des tests répétés donnent le même code d'échec, retraiter l'échantillon en commençant à partir du sang périphérique ou de l'aspiration de moelle osseuse.	10.11. <i>Digestion par enzyme de restriction (mutation TKD uniquement)</i> 10.2. <i>Préparation en vue du traitement des échantillons</i>
Q-Amp	Répéter en commençant à la quantification du ou des contrôles d'extraction, en utilisant les dilutions d'échantillons d'ADN déjà préparées.	10.9. <i>Quantification et dilution de l'ADN</i> 10.10. <i>Amplification (échantillons)</i>
Quant	Répéter en commençant à la quantification de tous les échantillons et du ou des contrôles d'extraction associés.	10.9. <i>Quantification et dilution de l'ADN</i>
Quant/Proc	Répéter les tests en suivant les instructions pour le code de répétition des tests Quant. Si les résultats des tests répétés donnent le même code d'échec, retraiter l'échantillon en commençant à partir du sang périphérique ou de l'aspiration de moelle osseuse.	10.9. <i>Quantification et dilution de l'ADN</i> 10.2. <i>Préparation en vue du traitement des échantillons</i>
Xtalk/Amp Xtalk/Q-Amp Xtalk/Quant/Proc	Préparer une nouvelle plaque d'électrophorèse capillaire de manière à ce que tous les échantillons soient séparés par 5 capillaires vides (c.-à-d. charger uniquement des échantillons dans les puits A01, C01, E01 et G01 pour l'injection 1. Charger des échantillons dans les puits équivalents pour les injections restantes). Si les résultats des tests répétés donnent le même code d'échec, répéter de nouveau les tests en suivant les instructions pour le code Amp, Q-Amp ou Quant, comme indiqué. Si les résultats des tests répétés en suivant les instructions du code Quant donnent le même code d'échec, retraiter l'échantillon en commençant à partir du sang périphérique ou de l'aspiration de moelle osseuse.	10.12. <i>Détection par électrophorèse capillaire</i> 10.9. <i>Quantification et dilution de l'ADN (contrôles d'extraction)</i> 10.10. <i>Amplification (échantillons, contrôle positif)</i> 10.2. <i>Préparation en vue du traitement des échantillons</i>

13.5. Plusieurs échecs au sein d'un programme

- 13.5.1. Contrairement aux résultats d'un échantillon ou d'un contrôle non valide isolé, certains codes d'échec peuvent être observés dans plusieurs, voire dans tous les puits de réaction. Lorsque ce type d'échec se produit, répéter l'analyse en incluant tous les échantillons, le contrôle positif, tous les contrôles d'extraction associés et le contrôle sans matrice conformément au Tableau 14 ; les codes de répétition des tests sont listés dans le Tableau 15 :
- 13.5.2. Les actions supplémentaires à prendre peuvent inclure :
- 13.5.2.1. Confirmer que les paramètres de l'option *Analysis Method (Méthode d'analyse)*, les paramètres de l'option *Size Standard (Marqueur de taille)* et les autres paramètres du logiciel GeneMapper sont corrects.
 - 13.5.2.2. S'assurer que toutes les étapes de la section impliquant GeneMapper ont été suivies car oublier une étape, comme par exemple ne pas appuyer sur le bouton vert de démarrage, peut entraîner des résultats erronés.
 - 13.5.2.3. Ouvrir le fichier au format CSV pour confirmer qu'il contient les résultats de tous les puits des échantillons et des contrôles qui ont un fichier 3500xL FSA associé.
 - 13.5.2.4. Dans le fichier au format CSV, s'assurer que les bonnes colonnes sont présentes, que les seuils des pics sont corrects (c.-à-d. pas de pics de moins de 100 pour Blue [Bleu] et Green [Vert] ou de moins de 50 pour Red [Rouge]) et que les colonnes sont remplies avec des nombres non nuls.
 - 13.5.2.5. Consulter l'électrophérogramme fourni par le logiciel GeneMapper pour visualiser la présence, la forme et la taille des pics.

Tableau 14 : Répétition des tests, plusieurs échecs au sein d'une analyse

Type d'échantillon	Code d'échec	Code de répétition des tests
PC ITD	IR31	Amp
NTC ITD	IR40	
EC ITD	IR51	
PC TKD	TR30	
NTC TKD	TR40	
EC TKD	TR50	
PC ITD	IR33	CE/Amp
Échantillon ITD	IR70	
PC TKD	TR32	
Échantillon TKD	TR71	
PC ITD	IR32	
EC ITD	IR52	
Échantillon ITD	IR80	
PC TKD	TR31	
EC TKD	TR51	
Échantillon TKD	TR81	
Tous les échantillons ITD au sein d'une injection	IR91	CE-SS
Tous les échantillons TKD au sein d'une injection	TR93	
Tous les échantillons ITD au sein d'une analyse	IR04	GM
Tous les échantillons TKD au sein d'une analyse	TR04	

Tableau 15 : Codes de répétition des tests, répétition des tests pour cause de plusieurs échecs

Code de répétition des tests	Description	Point de départ de la répétition des tests
Analysis/Amp	Répéter l'analyse dans GeneMapper, en s'assurant de bien appuyer sur le bouton vert de démarrage pour analyser les données (étape 10.18.6 Error! Reference source not found.). Si la répétition de l'analyse dans GeneMapper donne le même résultat, répéter en commençant à l'amplification, en utilisant les dilutions d'échantillons d'ADN déjà préparées. S'assurer que tous les tubes sont vortexés conformément aux instructions et que la Taq a été ajoutée.	10.18. <i>Analyse des données avec le logiciel GeneMapper</i> 10.10. <i>Amplification</i>
Amp	Répéter en commençant à l'amplification, en utilisant les dilutions d'échantillons d'ADN à tester déjà préparées. S'assurer que tous les tubes sont vortexés conformément aux instructions et que la Taq a été ajoutée.	10.10. <i>Amplification</i>
CE	Répéter en commençant à l'électrophorèse capillaire. Préparer une nouvelle plaque d'électrophorèse capillaire avec un amplicon frais (provenant de la plaque de PCR ITD ou de la plaque de digestion TDK stockée) et de la solution de marqueur de taille fraîchement préparée. S'assurer que le contrôle positif, le contrôle sans matrice et le ou les contrôles d'extraction associés sont également présents sur la plaque avec l'échantillon ayant échoué.	10.12. <i>Détection par électrophorèse capillaire</i>
CE/Amp	Répéter les tests en suivant les instructions pour le code de répétition des tests CE. Si les résultats des tests répétés donnent le même code d'échec, répéter de nouveau les tests en suivant les instructions pour le code Amp ou Q-Amp, comme indiqué.	10.9. <i>Quantification et dilution de l'ADN (contrôles d'extraction)</i> 10.10. <i>Amplification (échantillons)</i>
CE-SS	Répéter en commençant à l'électrophorèse capillaire, en utilisant une solution de marqueur de taille fraîchement préparée.	10.12. <i>Détection par électrophorèse capillaire</i>
GM	Répéter la création des fichiers d'exportation des données à partir du logiciel GeneMapper, en s'assurant que le ou les seuils sont définis sur 100 RFU.	10.18. <i>Analyse des données avec le logiciel GeneMapper</i>

13.6. Déplacement du fluorophore

En de rares occasions, avec de grands inserts ITD, le logiciel LeukoStrat CDx *FLT3* peut mal identifier la confirmation d'un pic muté. Le code d'échec **IR07** n'est pas nécessairement un vrai résultat non valide. Pour confirmer le déplacement du fluorophore, répéter l'électrophorèse capillaire en préparant une nouvelle plaque d'électrophorèse capillaire avec un amplicon frais provenant de la plaque de PCR ITD stockée. Si le code d'échec **IR07** se répète, le résultat de l'échantillon est valide et peut être transmis.

14. Limites de la procédure

- 14.1. Ne réaliser le test qu'avec les types d'échantillons indiqués car l'utilisation du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay n'a été validée qu'avec le sang périphérique et les aspirations de moelle osseuse. L'obtention de résultats fiables dépend d'un stockage et d'un traitement appropriés des échantillons, aussi se doit-on de suivre les procédures de cette notice.
- 14.2. Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay n'a été validé qu'en utilisant le kit QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit pour extraire l'ADN génomique.
- 14.3. Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay détectera les mutations ITD mesurant 3 pb à 323 pb ; cependant, le test n'a été validé que pour détecter les mutations mesurant 30 pb à 279 pb.
 - Les insertions ITD mesurant entre 3 pb et 30 pb seront rapportées comme étant des mutations ITD.
 - Les insertions ITD mesurant entre 279 pb et 323 pb seront rapportées comme étant des mutations ITD.
 - Les insertions ITD mesurant plus de 323 pb ne seront pas rapportées en tant qu'insertions.
- 14.4. Il est possible que ce test ne détecte pas les mutations *FLT3* se trouvant en dessous du niveau de sensibilité du test.
 - 14.4.1. Pour les insertions ITD mesurant entre 30 pb et 126 pb, inclus, un ratio allélique de 0,08 donnera un résultat positif avec le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
 - 14.4.2. Pour les insertions ITD mesurant entre 129 pb et 279 pb, inclus, un ratio allélique de 1 donnera un résultat positif avec le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
 - 14.4.3. Pour les mutations TKD qui modifient le site de restriction de l'enzyme EcoRV, un ratio allélique de 0,18 donnera un résultat positif avec le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 14.5. Toujours interpréter les résultats du test à la lumière des données cliniques et des autres tests effectués pour les patients.
- 14.6. La détection d'une mutation dépend du nombre de copies de la séquence mutée présentes dans l'échantillon et elle peut être influencée par l'intégrité de l'échantillon, la quantité d'ADN isolée et la présence de substances interférentes. Les analyses basées sur la PCR sont sujettes à des interférences dues à la dégradation de l'ADN ou à l'inhibition de la PCR par l'EDTA ou d'autres agents.
- 14.7. L'utilisation de ce produit doit se limiter au personnel formé aux techniques de PCR et à l'utilisation du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 14.8. Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay est un test qualitatif. Le test n'est pas destiné aux mesures quantitatives des mutations ITD ou TKD.
- 14.9. Le ratio allélique d'un échantillon ne peut pas être calculé, mesuré ou déterminé à l'aide de ce test.

15. Valeurs attendues

15.1. Taille attendue des produits amplifiés

15.1.1. Les tailles des amplicons indiquées ont été déterminées à l'aide d'un instrument 3500xL (Tableau 16 :).

REMARQUE : « Canal du fluorophore » indique la couleur des produits générés avec le mélange réactionnel lorsque les paramètres de couleur par défaut sont utilisés sur les systèmes de détection par fluorescence ABI.

Tableau 16 : Tailles attendues des amplicons

Mélange réactionnel	Réf. catalogue	Cible	Canal du fluorophore	ADN de contrôle	Taille du produit en nucléotides
<i>FLT3</i> ITD	R0880060 R0880080	Exons 14 et 15	Bleu et vert	Plage de taille valide <i>FLT3</i> ITD Positive Control <i>FLT3</i> Extraction Control	326 à 650 327±1, 357±1 327±1
<i>FLT3</i> TKD	R0880070 R0880080	Exon 20	Bleu	Plage de taille valide <i>FLT3</i> TKD Positive Control <i>FLT3</i> Extraction Control	78 à 80, 124 à 128 79±1, 127±1 79±1, 127±1

16. Évaluation de la performance non clinique

16.1. Tous les groupes évaluables

L'exactitude du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay a été déterminée en comparant les résultats du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay à une méthode de séquençage haut débit validée en utilisant des échantillons provenant d'un essai clinique. Les échantillons pour l'étude de comparaison des méthodes provenaient d'un sous-groupe d'échantillons de l'étude de pont (« bridging study ») de *FLT3* qui incluait tous les échantillons positifs pour une mutation de *FLT3* (CTA+), disponibles et évaluables, et environ 300 échantillons négatifs pour une mutation de *FLT3* (CTA-). Le sous-groupe d'échantillons négatifs a été sélectionné en utilisant un algorithme de randomisation, la proportion de chaque site de test de laboratoire du test de l'essai clinique (CTA) correspondant à la proportion de ce site pour l'ensemble de l'étude A2301. Après avoir tenu compte des échantillons ayant obtenu des résultats valides, 505 échantillons CTA+ ont été inclus ainsi que 263 échantillons CTA- pour un total de 768 échantillons de patients. Quatre des échantillons contenaient une quantité faible d'ADN et ont été testés pour rechercher l'écart. Sur les 764 résultats, 487 étaient positifs pour *FLT3* avec les deux tests et 230 étaient négatifs avec les deux tests comme le montre le Tableau 17 : . La concordance avec et sans les résultats non valides est présentée dans le Tableau 18.

Tableau 17 : concordance entre le test CDx et le séquençage à haut débit pour tous les échantillons

Test CDx	Séquençage		
	Positif	Négatif	Total
Positif	487	6	493
Négatif	31	230	261
Non valide	7	3	10
Total	525	239	764

Tableau 18 : Concordance entre le test CDx et le séquençage à haut débit

Mesure de la concordance	Sans les résultats non valides du test CDx		Avec les résultats non valides du test CDx	
	Pourcentage de concordance (n)	IC à 95 % ⁽¹⁾	Pourcentage de concordance (n)	IC à 95 % ⁽¹⁾
% de concordance positive	94,0 % (487/518)	(91,6 % ; 95,9 %)	92,8 % (487/525)	(90,2 % ; 94,8 %)
% de concordance négative	97,5 % (230/236)	(94,5 % ; 99,1 %)	96,2 % (230/239)	(93,0 % ; 98,3 %)
% de concordance globale	95,1 % (717/754)	(93,3 % ; 96,5 %)	93,8 % (717/764)	(91,9 % ; 95,4 %)

⁽¹⁾L'intervalle de confiance (IC) à 95 % est calculé à l'aide de la méthode dite exacte de Clopper-Pearson.

FLT3-ITD : la population dans laquelle une mutation ITD est détectée fait référence aux échantillons renfermant uniquement des mutations ITD d'après le séquençage. Parmi les 378 échantillons avec une mutation ITD, 64 % ne présentaient qu'un (1) variant ITD, le reste contenait plusieurs mutations ITD. La longueur de l'insert ITD variait de 3 pb à 209 pb. La plupart des échantillons avec des mutations ITD avaient des inserts d'une longueur inférieure à 100 pb (> 85 %). Trente-sept (37) des échantillons avec une mutation ITD contenaient des inserts d'une longueur supérieure ou égale à 100 pb. La distribution des tailles des mutations ITD est présentée dans la Figure 8 ci-dessous.

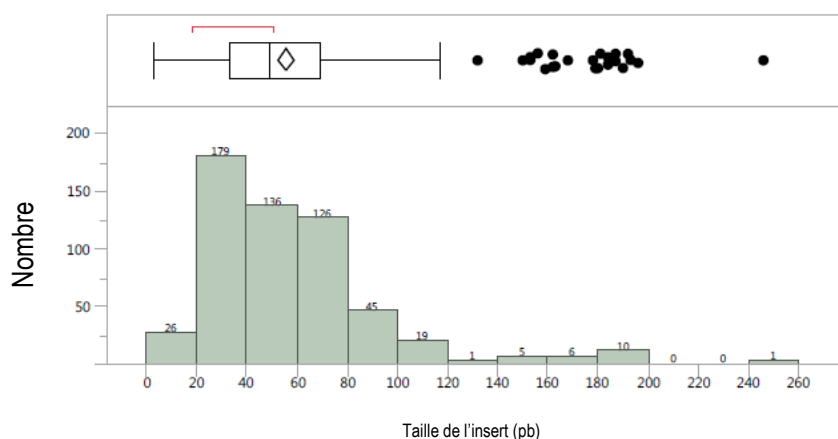


Figure 8 : Distribution des tailles des inserts ITD d'après le test CDx (381 échantillons positifs, N de tailles d'insert = 554, Moyenne = 55,6).

Neuf patients n'ont pas produit de résultats ITD valides avec le test CDx. Parmi les 764 échantillons analysés, 57 présentaient des résultats discordants. Sur ces 57 résultats discordants, 50 présentaient des reads faibles pour la fraction allélique du variant par séquençage et ils étaient rapportés comme étant négatifs pour la mutation avec le test CDx d'après le seuil clinique (rapport des signaux = 0,05). Les estimations ponctuelles du pourcentage de concordance positive, du pourcentage de concordance négative et du pourcentage de concordance globale sont respectivement de 86,8 %, 97,3 % et 91,4 %, en incluant les résultats non valides du test CDx (Tableau 19). Sans les résultats non valides du test CDx, les pourcentages de concordance positive, de concordance négative et de concordance globale sont de 88 % ou plus.

Tableau 19 : Concordance pour ITD entre le test CDx et le séquençage pour les résultats *FLT3*-ITD

Mesure de la concordance	Sans les résultats non valides du test CDx		Avec les résultats non valides du test CDx	
	Pourcentage de concordance (n)	IC à 95 % ⁽¹⁾	Pourcentage de concordance (n)	IC à 95 % ⁽¹⁾
% de concordance positive	88,0 % (375/426)	(84,6 % ; 91,0 %)	86,8 % (375/432)	(83,2 % ; 89,9 %)
% de concordance négative	98,2 % (323/329)	(96,1 % ; 99,3 %)	97,3 % (323/332)	(94,9 % ; 98,8 %)
% de concordance globale	92,5 % (698/755)	(90,3 % ; 94,2 %)	91,4 % (698/764)	(89,1 % ; 93,3 %)

⁽¹⁾L'intervalle de confiance (IC) à 95 % est calculé à l'aide de la méthode dite exacte de Clopper-Pearson.

FLT3-TKD : la population dans laquelle une mutation TKD est détectée fait référence aux échantillons renfermant uniquement des mutations TKD d'après le séquençage haut débit. Parmi les 94 échantillons avec une mutation TKD, 79 % présentaient un (1) variant TKD (substitution ou délétion) alors que 20/94 (21 %) contenaient deux variants TKD. Comme on s'y attendait, la mutation prédominante a été la substitution d'un seul nucléotide au niveau du codon D835, principalement la mutation D835Y. Les mutations D835H, D835V et I836S ont également été observées à une prévalence moindre. Treize pour cent (13 %) des échantillons positifs pour une mutation TKD contenaient le variant de délétion au niveau du codon I836 soit en tant que délétion seule soit en tant que délétion plus substitution.

Cent-trente-sept (92,6 %) des 148 échantillons, identifiés comme positifs pour une mutation TKD par séquençage, ont été identifiés comme positifs pour TKD par le test CDx. Six-cent-onze (98,2 %) des 616 échantillons, identifiés comme négatifs pour une mutation TKD par séquençage, ont été identifiés comme négatifs pour TKD par le test CDx. Huit des échantillons de patients ont produit un résultat TKD non valide avec le test CDx et 8 des 764 échantillons testés étaient discordants. Les 8 résultats discordants présentaient des reads faibles pour la fraction allélique du variant par séquençage haut débit et ils étaient rapportés comme étant négatifs pour la mutation avec le test CDx car le rapport des signaux se situait en dessous du seuil du test. Le Tableau 20 présente les résultats pour la concordance TKD, avec et sans les résultats non valides.

Tableau 20 : Concordance pour TKD entre le test CDx et le séquençage pour les résultats *FLT3* TKD

Mesure de la concordance	Sans les résultats non valides du test CDx		Avec les résultats non valides du test CDx	
	Pourcentage de concordance (n)	IC à 95 % ⁽¹⁾	Pourcentage de concordance (n)	IC à 95 % ⁽¹⁾
% de concordance positive	94,5 % (137/145)	(89,4 % ; 97,6 %)	92,6 % (137/148)	(87,1 % ; 96,2 %)
% de concordance négative	100,0 % (611/611)	(99,4 % ; 100,0 %)	99,2 % (611/616)	(98,1 % ; 99,7 %)
% de concordance globale	98,9 % (748/756)	(97,9 % ; 99,5 %)	97,9 % (748/764)	(96,6 % ; 98,8 %)

⁽¹⁾L'intervalle de confiance (IC) à 95 % est calculé à l'aide de la méthode dite exacte de Clopper-Pearson.

Les résultats ont été analysés séparément pour le sang périphérique et la moelle osseuse et se sont avérés être comparables.

16.2. Sensibilité analytique : limite du blanc (LoB)

Lorsque les échantillons contenant de l'ADN de type sauvage uniquement (c.-à-d. sans mutation) ont été analysés avec le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, le rapport des signaux était de 0,00 avec le test ITD et il était compris entre 0,00 et 0,01 avec le test TKD. Cette limite du blanc est bien en dessous du rapport des signaux du seuil clinique de 0,05.

16.3. Sensibilité analytique

La limite de détection (LoD) du test a été évaluée dans deux études. La première étude a utilisé des échantillons artificiels créés en mélangeant des lignées cellulaires avec du sang total dépourvu de leucocytes. Les échantillons des lignées cellulaires ont été utilisés pour représenter trois tailles d'insert ITD, à savoir 30 pb, 126 pb et 279 pb, comme décrit dans le Tableau 21. Les échantillons des lignées cellulaires ont été utilisés pour représenter trois tailles d'insert ITD, à savoir 30 pb, 126 pb et 279 pb ainsi qu'une mutation TKD D835. L'ADN a été dilué à 5 ng/μl, 10 ng/μl et 15 ng/μl, puis testé à deux ratios alléliques pour chacune des lignées cellulaires. Une seconde étude avec des échantillons cliniques a été menée pour confirmer les observations de la LoD obtenues avec les lignées cellulaires. Cinq échantillons cliniques ont été dilués avec des échantillons cliniques négatifs afin d'obtenir un rapport des signaux ciblé dans la plage linéaire d'une courbe standard de lignées cellulaires appropriée (Tableau 21). Chaque échantillon a été dilué selon 5 niveaux de rapport des signaux : négatif bas (LN), négatif haut (HN), proche du seuil (CO), positif bas (LP) et positif moyen (MP). Ces échantillons se trouvant dans la plage linéaire ont été testés avec le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, puis une valeur du rapport des signaux moyenne a été déterminée. Chaque dilution d'échantillon clinique pour déterminer la LoD a été testée 20 fois pour chaque niveau de dilution sur quatre jours non consécutifs (5 analyses répétées par jour) par un seul opérateur utilisant un seul appareillage. Le ratio allélique pour chaque dilution d'échantillon clinique pour déterminer la LoD a été calculé en utilisant le ratio allélique estimé à partir des courbes standard des lignées cellulaires. Les ratios alléliques des échantillons cliniques pour déterminer la LoD ont été estimés selon l'étude, répondant aux critères d'acceptation suivants :

- 16.3.1. Les rapports des signaux et les ratios alléliques où des mutations de *FLT3* peuvent être détectées au-dessus de la limite du blanc (LoB) dans ≥ 95 % des analyses répétées (LoD analytique).
- 16.3.2. Le ratio allélique proche du seuil clinique, un rapport des signaux compris entre 0,04 et 0,06 (seuil).
- 16.3.3. Les ratios alléliques et les rapports des signaux détectés au-dessus du seuil clinique dans ≥ 95 % des analyses répétées (au-dessus du seuil).

Tableau 21 : Rapport des signaux (SR), rapport allélique (AR) et limite de détection (LoD) pour chaque échantillon et niveau de dilution

Identifiant échantillon	Mutation	Niveau	Rapport des signaux ciblé	SR moyen	AR du mélange	N valides	n (%) SR > LoB	n (%) SR > 0,05	*Classification
TKD CS1	TKD I836	LN	0,02	0,02	0,039	20	20 (100,0)	0	LoD analytique
		HN	0,03	0,03	0,057	20	20 (100,0)	0	-
		CO	0,05	0,05	0,094	20	20 (100,0)	16 (80,0 %)	Seuil
		LP	0,08	0,07	0,144	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Au-dessus du seuil
		MP	0,13	0,12	0,224	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
TKD CS2	TKD D835	LN	0,01	0,02	0,023	20	20 (100,0)	0	LoD analytique
		HN	0,02	0,03	0,047	20	20 (100,0)	0	-
		CO	0,04	0,05	0,089	20	20 (100,0)	19 (95,0)	Seuil - Au-dessus du seuil
		LP	0,07	0,08	0,152	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
		MP	0,13	0,15	0,269	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-

Tableau 21 : Rapport des signaux (SR), rapport allélique (AR) et limite de détection (LoD) pour chaque échantillon et niveau de dilution

Identifiant échantillon	Mutation	Niveau	Rapport des signaux ciblé	SR moyen	AR du mélange	N valides	n (%) SR > LoB	n (%) SR > 0,05	*Classification
ITD CS1	ITD 24 pb	LN	0,02	0,02	0,044	20	20 (100,0)	0	LoD analytique
		HN	0,03	0,03	0,065	20	20 (100,0)	0	-
		CO	0,05	0,05	0,107	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Seuil - Au-dessus du seuil
		LP	0,08	0,08	0,165	20	19 (95,0)	19 (95,0)	-
		MP	0,13	0,13	0,257	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
ITD CS2	ITD 66 pb	LN	0,02	0,02	0,045	20	20 (100,0)	0	LoD analytique
		HN	0,03	0,03	0,066	20	20 (100,0)	0	-
		CO	0,05	0,05	0,110	20	20 (100,0)	18 (90,0)	Seuil
		LP	0,09	0,08	0,189	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Au-dessus du seuil
		MP	0,14	0,13	0,280	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
ITD CS3	ITD 217 pb	LN	0,01	0	0,073	20	2 (10,0)	0	-
		HN	0,02	0,02	0,147	20	15 (75,0)	0	-
		CO	0,04	0,04	0,276	20	20 (100,0)	9 (45,0)	LoD analytique Seuil
		LP	0,08	0,08	0,539	20	19 (95,0)	19 (95,0)	Au-dessus du seuil
		MP	0,13	0,13	0,838	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
Vrai nég. ITD	Aucune	TN	S.O.	0	0	20	0	0	S.O.
Vrai nég. TKD	Aucune	TN	S.O.	0	0	20	0	0	S.O.

*Les classifications sont définies comme suit. 1 : LoD analytique = ratio allélique le plus bas où les échantillons ont été détectés 95 % du temps au-dessus de la LoB, 2 : seuil = ratio allélique où les échantillons étaient proches d'un rapport des signaux de 0,05 et 3 : au-dessus du seuil = ratio allélique le plus bas où les échantillons pouvaient être détectés 95 % du temps au-dessus d'un rapport des signaux de 0,05.

Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay est capable de détecter les ratios alléliques muté/sauvage suivants au seuil clinique des types de mutations suivantes :

- 16.3.4. Pour les insertions ITD mesurées à 24 pb, un ratio allélique de 0,107 a été détecté au-dessus du rapport des signaux du seuil dans plus de 95 % des échantillons. Le coefficient de variation (%CV) du rapport des signaux pour ces échantillons était de 7,1 %.
- 16.3.5. Pour les insertions ITD mesurées à 66 pb, un ratio allélique de 0,189 a été détecté au-dessus du rapport des signaux du seuil dans plus de 95 % des échantillons. Le coefficient de variation (%CV) du rapport des signaux pour ces échantillons était de 7,1 %.
- 16.3.6. Pour les insertions ITD mesurées à 217 pb, un ratio allélique de 0,539 a été détecté au-dessus du rapport des signaux du seuil dans plus de 95 % des échantillons. Le coefficient de variation (%CV) du rapport des signaux pour ces échantillons était de 25,6 %.
- 16.3.7. Pour les mutations TKD au niveau du codon D835 qui détruisent le site de restriction EcoRV, un ratio allélique de 0,089 a été détecté au-dessus du rapport des signaux du seuil dans plus de 95 % des échantillons. Le coefficient de variation (%CV) du rapport des signaux pour ces échantillons était de 4,5 %.
- 16.3.8. Pour les mutations TKD au niveau du codon I836 qui détruisent le site de restriction de l'enzyme EcoRV, un ratio allélique de 0,144 a été détecté au-dessus du rapport des signaux du seuil dans plus de 95 % des échantillons. Le coefficient de variation (%CV) du rapport des signaux pour ces échantillons était de 5,7 %.

Le Tableau 22 ci-dessous donne la conversion des valeurs du ratio allélique en % de mutation.

Tableau 22 : Sensibilité analytique du ratio allélique et pourcentage de mutation

Identifiant échantillon	Mutation	Classification de la mutation	Au-dessus du rapport des signaux du seuil ≥ 0,05 à 95 %		
			AR	SR	%Muté
TKD CS1	TKD I836	Délétion TKD I836	0,144	0,07	12,6
TKD CS2	TKD D835	Substitution TKD D835	0,089	0,05	8,2
ITD CS1	ITD 24 pb	Petit insert ITD < 30 pb	0,107	0,05	9,7
ITD CS2	ITD 66 pb	Insert ITD moyen 30 à 100 pb	0,189	0,08	15,9
ITD CS3	ITD 217 pb	Grand insert ITD environ 200 pb	0,539	0,08	35,0

16.4. Précision

La précision du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay a été déterminée par trois opérateurs qui ont, de façon indépendante, testés 10 fois chacun des échantillons contenant une mutation ITD avec des inserts dont la taille variait entre 30 pb et 126 pb et chacun des échantillons contenant une mutation TKD. Les dix analyses répétées ont été testées par séries de deux, à cinq reprises.

- 16.4.1. Pour les échantillons contenant une mutation ITD, les plages du %CV du rapport des signaux pour les trois opérateurs étaient de 7,4 % à 15,0 %, de 3,7 % à 13,0 % et de 4,2 % à 8,8 %.
- 16.4.2. Pour les échantillons contenant une mutation TKD, les plages du %CV du rapport des signaux pour les trois opérateurs étaient de 6,3 % à 11,2 %, de 5,8 % à 9,3 % et de 5,5 % à 8,3 %.

16.5. Reproductibilité inter-opérateurs (lignées cellulaires)

Les échantillons étaient constitués de lignées cellulaires porteuses d'une mutation ITD contenant des inserts de 30 pb et de 126 pb et de la mutation TKD D835. Les échantillons représentaient les rapports des signaux muté/sauvage de niveau faible (proche du seuil), moyen et élevé (lignée cellulaire 100 % mutée) pour l'insert ITD de petite taille, l'insert ITD de grande taille et la mutation TKD. Trois opérateurs, utilisant un seul lot de réactifs et un seul instrument sur 15 séries, ont testé 10 fois chacun les échantillons, le %CV du rapport des signaux variait de 6,6 % à 13,3 %.

- 16.5.1. Pour les échantillons contenant une mutation TKD, le %CV du rapport des signaux variait de 7,9 % à 9,3 %.
- 16.5.2. Pour les échantillons contenant une mutation ITD dont la taille des inserts allait jusqu'à 30 pb inclus, le %CV du rapport des signaux variait de 6,6 % à 16,1 %.
- 16.5.3. Pour les échantillons contenant une mutation ITD dont la taille des inserts allait jusqu'à 126 pb inclus, le %CV du rapport des signaux variait de 9,0 % à 13,3 %.

16.6. Reproductibilité inter-opérateurs (échantillons cliniques)

Dans une seconde étude, la précision a été évaluée à l'aide d'échantillons cliniques d'ADN provenant de 8 échantillons cliniques (4 de sang périphérique et 4 de moelle osseuse) avec des inserts ITD de 21 pb, 24 pb, 66 pb, 90 pb et 217 pb, une substitution TKD D835, une délétion TKD I836 et d'échantillons négatifs pour *FLT3*. L'ADN des échantillons cliniques négatifs pour *FLT3* a été poolé et utilisé pour diluer les échantillons positifs pour *FLT3* afin d'obtenir trois niveaux de rapport des signaux ciblés proches du seuil clinique du test, c.-à-d. un négatif haut, un positif bas et un positif moyen). Cinq échantillons cliniques positifs pour *FLT3* provenaient de sang périphérique et deux de moelle osseuse. Cinq (5) échantillons positifs pour ITD, 2 échantillons positifs pour TKD et un échantillon poolé vrai négatif ont été testés en triple par trois opérateurs/groupes d'instruments différents en utilisant un (1) lot de réactifs sur cinq jours non consécutifs, à trois niveaux de dilution pour les échantillons positifs et non dilué pour l'échantillon négatif. Au total, chaque opérateur a testé les échantillons 15 fois par niveau de dilution, pour un total de 45 tests par niveau de dilution.

Le tableau ci-dessous présente le %CV total de tous les types de mutation et niveaux de dilution ; le %CV pour tous les types de mutation, sauf l'échantillon contenant un insert ITD long (217 pb), variait de 4,2 % à 16,1 %. Le %CV de l'échantillon avec une mutation de 217 pb variait de 26,9 % à 27,2 % (Tableau 23). Le %CV du niveau de dilution positif bas (LP) était de 26,9 % pour l'insert de 217 pb, il ne répondait donc pas aux critères d'acceptation de l'étude qui demandaient un $CV \leq 25\%$ pour le rapport des signaux. Les résultats montrent que les mutations TKD D835 et I836 répondaient aux critères d'acceptation, tout comme les mutations ITD allant jusqu'à 217 pb. La variation pour la mutation ITD de 217 pb dépassait 25 %, indiquant ainsi une plus grande imprécision pour les mutations ITD plus grandes.

Tableau 23 : Composantes de la variance par type de mutation et niveau de dilution

Identifiant échantillon	Type de mutation	Niveau de dilution	SR moyen	Variation du rapport des signaux (SR) due à			Variation totale	
				Opérateur / Instrument ET (%)	Jour de la série ET (%)	Erreur aléatoire ET (%)	ET	%CV
É1	TKD I836	HN	0,03	0,000 (3,22 %)	0,000 (0,00 %)	0,002 (96,78 %)	0,002	7,1
		LP	0,077	0,001 (2,60 %)	0,000 (0,00 %)	0,005 (97,40 %)	0,005	5,9
		MP	0,132	0,002 (6,67 %)	0,003 (17,43 %)	0,005 (75,90 %)	0,006	4,6
É2	TKD D835	HN	0,04	0,001 (7,13 %)	0,000 (0,00 %)	0,002 (92,87 %)	0,002	5,3
		LP	0,08	0,002 (14,02 %)	0,001 (2,47 %)	0,004 (83,51 %)	0,004	5,3
		MP	0,165	0,003 (16,28 %)	0,000 (0,00 %)	0,007 (83,72 %)	0,007	4,2
É3	ITD 21 pb	HN	0,03	0,000 (0,00 %)	0,000 (0,00 %)	0,001 (100,0 %)	0,001	5
		LP	0,074	0,000 (0,00 %)	0,002 (8,08 %)	0,005 (91,92 %)	0,005	7,2
		MP	0,133	0,002 (14,46 %)	0,000 (0,00 %)	0,005 (85,54 %)	0,006	4,4

Tableau 23 : Composantes de la variance par type de mutation et niveau de dilution

Identifiant échantillon	Type de mutation	Niveau de dilution	SR moyen	Variation du rapport des signaux (SR) due à			Variation totale	
				Opérateur / Instrument ET (%)	Jour de la série ET (%)	Erreur aléatoire ET (%)	ET	%CV
É4	ITD 24 pb	HN	0,029	0,000 (0,00 %)	0,000 (0,00 %)	0,004 (100,0 %)	0,004	15,2
		LP	0,07	0,000 (0,00 %)	0,000 (0,92 %)	0,004 (99,08 %)	0,004	5,3
		MP	0,147	0,002 (8,20 %)	0,001 (3,28 %)	0,006 (88,52 %)	0,007	4,5
É5	ITD 66 pb	HN	0,029	0,001 (4,28 %)	0,000 (0,00 %)	0,005 (95,72 %)	0,005	16,1
		LP	0,083	0,000 (0,00 %)	0,001 (1,13 %)	0,007 (98,87 %)	0,007	8
		MP	0,185	0,000 (0,00 %)	0,000 (0,00 %)	0,010 (100,0 %)	0,01	5,3
É6	ITD 90 pb	HN	0,03	0,001 (5,15 %)	0,000 (0,00 %)	0,003 (94,85 %)	0,003	10,1
		LP	0,091	0,004 (25,23 %)	0,002 (8,42 %)	0,007 (66,35 %)	0,008	8,5
		MP	0,206	0,013 (44,26 %)	0,005 (7,34 %)	0,013 (48,40 %)	0,019	8,5
É7	ITD 217 pb	HN	0,032	0,001 (0,90 %)	0,002 (7,20 %)	0,008 (91,90 %)	0,009	27,2
		LP	0,079	0,013 (31,42 %)	0,009 (14,86 %)	0,017 (53,71 %)	0,023	26,9
		MP	0,162	0,029 (36,75 %)	0,015 (9,86 %)	0,035 (53,39 %)	0,047	27,2

16.7. Reproductibilité inter-lots et inter-instruments

La reproductibilité inter-lots et inter-instruments a été déterminée par un seul opérateur analysant le même ensemble d'échantillons à l'aide de 3 lots de réactifs sur 3 groupes d'instruments. Les échantillons des lignées cellulaires étaient constitués d'échantillons porteurs d'une mutation ITD contenant des inserts dont la taille variait de 30 pb à 126 pb et d'échantillons porteurs d'une mutation TKD.

16.7.1. Pour les échantillons porteurs d'une mutation ITD, le %CV du rapport des signaux variait de 3,0 % à 8,4 %.

16.7.2. Pour les échantillons porteurs d'une mutation TKD, le %CV du rapport des signaux variait de 5,4 % à 10,6 %.

16.8. Substances interférentes - Substances exogènes

Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay est capable de détecter des mutations ITD mesurant 15 pb à 114 pb ainsi que des mutations TKD en présence d'héparine sodique ou d'EDTA et du tampon de lavage utilisé pendant la procédure d'extraction de l'ADN.

16.9. Substances interférentes - Substances endogènes

Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay est capable de détecter des mutations ITD mesurant 18 pb à 114 pb ainsi que des mutations TKD en présence de lipides/triglycérides, d'hémoglobine, de protéines et de bilirubine.

16.10. Substances interférentes - Médicaments

Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay est capable de détecter des mutations ITD mesurant 18 pb à 114 pb ainsi que des mutations TKD en présence de cytarabine et de daunorubicine.

16.11. Contamination par transfert et contamination croisée

La contamination par transfert et la contamination croisée ne se sont pas montrées problématiques pour le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay lorsque celui-ci a été testé via des configurations typiques de plans de plaque en échiquier :

16.11.1. Aucune contamination par transfert/contamination croisée n'a été détectée (0 %).

16.11.2. Le taux d'échec du contrôle sans matrice pour les tests ITD et TKD était nul (0 %).

16.12. Quantité d'ADN de départ

Le but de cette étude était d'apporter la preuve de l'équivalence lorsque l'on utilisait une quantité d'ADN de départ de 10 ± 3 ng/ μ L dans le test. Des échantillons d'ADN extrait en plusieurs exemplaires provenant de l'étude sur la limite de détection et la plage dynamique avec des échantillons artificiels ont été utilisés en testant uniquement les échantillons ayant le ratio allélique le plus faible parmi les membres du panel d'échantillons. Les échantillons d'ADN listés ci-dessous ont été dilués à 7, 10 et 13 ng/ μ L, puis testés avec le test en même temps qu'un contrôle négatif testé en simple.

- 16.12.1. ITD 30 pb, de ratio allélique 0,03 (en 33 exemplaires pour chaque quantité d'ADN de départ)
- 16.12.2. TKD D835, de ratio allélique 0,05 (en 33 exemplaires)
- 16.12.3. ITD 126 pb, de ratio allélique 0,05 (en 22 exemplaires)
- 16.12.4. ITD 279 pb, de ratio allélique 1 (en 11 exemplaires)

Les cellules porteuses d'une mutation ITD 30 pb, ITD 126 pb et TKD D835 répondaient aux critères d'acceptation : 1) $> 93,9$ % des échantillons testés en plusieurs exemplaires répondaient aux critères de validité des échantillons pour chaque type d'échantillon et quantité d'ADN de départ ; 2) le coefficient de variation (CV) global était $< 20,5$ % pour chaque type d'échantillon et 3) le CV était $< 21,0$ % pour chaque type d'échantillon lorsque les échantillons testés en plusieurs exemplaires étaient poolés entre 7 et 10 ng/ μ L et entre 13 et 10 ng/ μ L d'ADN de départ. La lignée cellulaire contenant un insert ITD long ne répondait pas aux critères d'acceptation. Alors que 100 % des échantillons testés en plusieurs exemplaires répondaient aux critères de validité des échantillons, le CV global et le CV parmi les quantités d'ADN de départ poolés dépassaient 25 %.

La différence entre les rapports des signaux muté/sauvage moyens observée parmi les quantités d'ADN de départ n'excédait pas 0,022 et les différences entre les moyennes n'étaient pas significativement différentes. Lorsqu'il est réalisé avec des quantités d'ADN de départ de 10 ± 3 ng/ μ L, le test est en mesure de produire des résultats réguliers.

17. Évaluation de la performance clinique

17.1. Présentation de l'étude de pont (« bridging study ») pivot (IVS-002-001)

- 17.1.1. Afin d'étayer l'évaluation de la sécurité et de l'efficacité du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, il était nécessaire de mettre en évidence la concordance clinique entre les échantillons dont le statut du gène *FLT3* a été déterminé à partir du test de l'essai clinique (CTA) A2301 et le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay dans la population en intention de tester. Cette étude de pont pivot pour le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay correspond à l'étude clinique de phase III CPKC412A2301 (A2301, CALBG 10603, RATIFY) portant sur la midostaurine chez les patients chez lesquels une LAM avec mutations de *FLT3* a récemment été diagnostiquée. Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay est conçu pour aider les médecins à prendre des décisions en termes de traitement pour les patients atteints de LAM présentant des mutations de *FLT3*.
- 17.1.2. Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay a été développé par Invivoscribe en tant que test diagnostique compagnon à utiliser pour faciliter l'évaluation des patients atteints de LAM pour lesquels un traitement par midostaurine est envisagé. La concordance avec le test CTA et l'efficacité du médicament, après stratification par le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, a été évaluée dans cette étude de pont. Une évaluation supplémentaire de la concordance entre la moelle osseuse et le sang périphérique et une comparaison des tests CTA/CDx avec une méthode de test indépendante ont été réalisées.

17.2. Objectifs de l'étude (IVS-002-001)

- 17.2.1. Les objectifs principaux de l'étude étaient 1) d'établir la concordance quant à la sélection des patients présentant une mutation de *FLT3* entre le test CTA de l'étude A2301 et le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, en évaluant le pourcentage de concordance globale, de concordance positive et de concordance négative entre les deux tests, et 2) d'estimer l'efficacité de la midostaurine sur les deux taux de survie globale dans la population positive avec le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 17.2.2. Les objectifs secondaires de l'étude étaient 1) d'identifier de potentielles covariables démographiques et covariables liées à l'évolution de la maladie influençant la relation entre le diagnostic et l'efficacité, et 2) de présenter la preuve objective que l'ADNg extrait de cellules mononucléées isolées soit à partir de la moelle osseuse soit à partir du sang périphérique fournit des résultats concordants pour les deux types d'échantillons avec le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay en comparant des échantillons appariés.
- 17.2.3. Les autres tests et analyses comprenaient l'évaluation de la présence ou de l'absence d'une mutation de *FLT3* par séquençage de nouvelle génération (NGS) en utilisant la méthode de séquençage d'ADN haut débit comme source d'information indépendante sur la séquence.

17.3. Population de patients (IVS-002-001)

- 17.3.1. Plus de 3 000 patients ont été évalués à l'aide du test de l'essai clinique afin de recruter 717 patients dans l'essai A2301. Les tests ont été réalisés en suivant un protocole de test commun dans 9 sites de laboratoire de test désignés. Les patients étaient recrutés dans l'essai A2301 en fonction de l'identification de mutations de *FLT3* dans un échantillon de moelle osseuse ou de sang périphérique. Le seuil clinique du test pour l'essai était fixé à 0,05 (rapport des signaux muté/sauvage).
- 17.3.2. Le groupe d'analyse de la concordance (N = 1 100) incluait un sous-groupe de patients ayant fourni un consentement éclairé et qui ont été testés avec le test CDx. L'analyse de la concordance entre le test CTA et le test CDx a utilisé la population du groupe d'analyse de la concordance. Pour les patients pour lesquels des échantillons à la fois de moelle osseuse et de sang périphérique étaient disponibles, seuls les résultats du test CDx réalisé sur l'échantillon de moelle osseuse ont été utilisés dans l'analyse statistique, comme défini dans le protocole de l'étude de pont.

17.4. Sélection des patients et aliquots pour la réalisation du test *FLT3* CDx (IVS-002-001)

- 17.4.1. Le groupe de patients de l'étude de pont a été sélectionné à partir d'échantillons disponibles conservés dans des banques d'échantillons et d'après les informations du consentement éclairé disponibles à l'époque. Les échantillons de 618 patients inclus dans l'essai (CTA+) étaient disponibles. Un nombre égal de patients non inclus dans l'essai (présomés CTA-) ont également été sélectionnés, avec un excédent de 15 % en prévision de potentiels résultats positifs pour une mutation de *FLT3* parmi les patients non inclus dans l'essai.
- 17.4.2. L'étude de pont sélectionnée comprenait 503 échantillons de patients inclus dans l'essai positifs avec le test CTA et 555 échantillons négatifs avec le test CTA.
- 17.4.3. Une fois les patients identifiés, un aliquot de l'échantillon était sélectionné par patient. Parmi les patients ayant des échantillons de moelle osseuse et de sang périphérique (110 patients inclus dans l'essai et 123 patients non inclus dans l'essai), un aliquot de chacun des types d'échantillons a été sélectionné afin d'étayer la comparaison des types d'échantillons. Pour les patients disposant des deux types d'échantillons, le résultat du test sur la moelle osseuse a été utilisé pour l'analyse de la concordance des tests CTA/CDx et l'analyse de l'efficacité clinique.

17.5. Analyse de la sécurité (IVS-002-001)

- 17.5.1. Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay ne devrait pas causer directement d'effets indésirables réels ou potentiels, mais les résultats du test peuvent avoir un impact direct sur les risques associés au traitement du patient.

17.6. Efficacité (IVS-002-001)

- 17.6.1. Les analyses de validation clinique principales du test CDx ont été réalisées en utilisant des échantillons provenant de 1 058 patients atteints de LAM issus de la population de l'étude A2301. Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay était en concordance avec le test CTA et avait une efficacité similaire à l'étude A2301 et une exactitude similaire par rapport au séquençage haut débit (Tableau 24).
- 17.6.1.1. L'analyse principale a mis en évidence ce qui suit :
- 17.6.1.1.1 La concordance entre les tests CTA/CDx pour le statut du gène *FLT3* était élevée (> 97 %), avec le pourcentage de concordance positive, le pourcentage de concordance négative et le pourcentage de concordance globale bien au-dessus des critères d'acceptation de 90 % pour la concordance positive et négative.

Tableau 24 : Tableau de la concordance globale entre le test CDx et le test CTA

<i>FLT3</i> CDx	<i>FLT3</i> CTA	
	+	-
+	489	8
-	9	540
Non valide	5	7
Total	503	555

- « Non valide » signifie que l'échantillon a été testé à l'aide du test CDx, mais qu'il n'a pas donné de résultat valide.

17.6.1.1.2 Les concordances (IC à 95 %) sont les suivantes :

- 17.6.1.1.2.1 Pourcentage de concordance positive 97,2 % (95,4 %, 98,5 %)
- 17.6.1.1.2.2 Pourcentage de concordance négative 97,3 % (95,6 %, 98,5 %)
- 17.6.1.1.2.3 Pourcentage de concordance globale 97,3 % (96,1 %, 98,2 %)

17.6.2. La concordance entre les tests CTA/CDx pour les tests individuels ITD et TKD (% de concordance positive, % de concordance négative, % de concordance globale) était supérieure à 90 % (Tableau 25 et Tableau 26).

Tableau 25 : Tableau de la concordance entre le test ITD CDx et le test ITD CTA

ITD CDx	ITD CTA	
	+	-
+	378	5
-	6	660
Non valide	4	5
Total	388	670

- « Non valide » signifie que l'échantillon a été testé à l'aide du test CDx, mais qu'il n'a pas donné de résultat valide.

Tableau 26 : Tableau de la concordance entre le test TKD CDx et le test TKD CTA

TKD CDx	TKD CTA	
	+	-
+	127	12
-	6	902
Non valide	2	8
Total	135	922

- « Non valide » signifie que l'échantillon a été testé à l'aide du test CDx, mais qu'il n'a pas donné de résultat valide.

17.6.3. Dans l'essai clinique, l'efficacité a été établie en se basant sur la survie globale à l'aide du test CTA, la survie globale étant mesurée à partir de la date de la randomisation jusqu'au décès, toutes causes confondues. L'analyse principale a été réalisée après un suivi minimal d'environ 3,5 années après la randomisation du dernier patient. Le traitement par midostaurine + chimiothérapie classique était supérieur au traitement par placebo + chimiothérapie en termes de survie globale (HR : 0,77 ; IC à 95 % 0,63, 0,95 ; valeur p bilatérale = 0,016) (Figure 9). Parce que les courbes de survie ont atteint un plateau avant même d'atteindre la médiane, la survie médiane n'a pas pu être estimée de manière fiable.

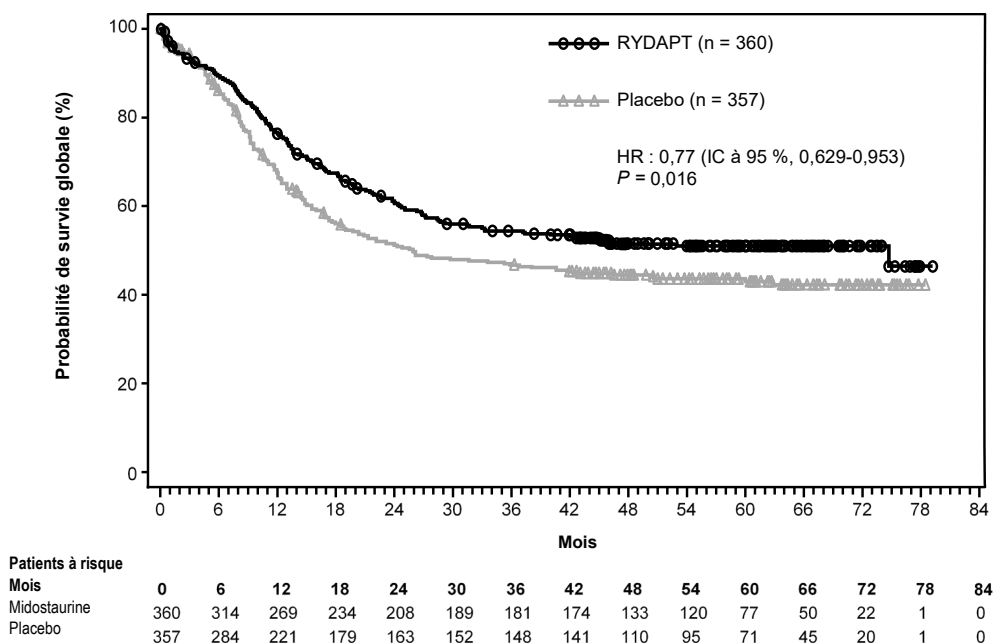


Figure 9 : Courbe de survie de Kaplan-Meier pour la survie globale dans la population CTA+ de l'essai A2301.

17.7. Efficacité dans la population (CTA+, CDx+) (489 sujets) : (IVS-002-001)

- 17.7.1. Une estimation de l'efficacité de la midostaurine sur la survie globale dans la population CDx+ a été réalisée. L'efficacité déterminée dans la population (CTA+, CDx+) était similaire entre les résultats globaux de l'essai clinique A2301 et le sous-groupe testé avec le test CDx et pour les deux taux de survie globale sans censure au moment de la greffe de cellules souches (voir Figure 9 et Figure 10, respectivement). Les résultats du hazard ratio (IC à 95 %) pour la survie globale étaient de 0,67 (0,52, 0,87) contre une survie globale de 0,77 (0,63, 0,95) pour l'étude A2301.

Étude de pont
CPKC412A2301/CALGB10603 - bridging study

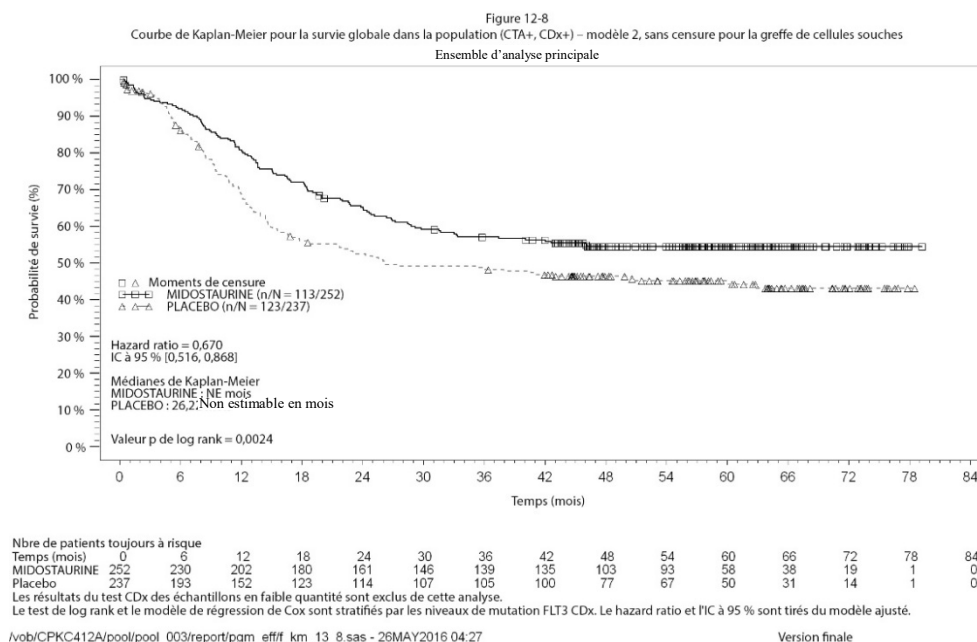


Figure 10 : Courbe de survie de Kaplan-Meier pour la survie globale dans la population CTA+ CDx + de l'essai A2301.

L'analyse secondaire et d'autres analyses ont mis en évidence ce qui suit :

- 17.7.1.1. Les caractéristiques démographiques et pronostiques importantes sur le plan clinique, comme par exemple les facteurs cytogénétiques de la leucémie, étaient bien équilibrées entre les populations évaluables et non évaluables par le test CDx ainsi qu'entre les bras de traitement et le placebo.
- 17.7.1.2. La concordance entre le sang périphérique et la moelle osseuse (% de concordance positive et % de concordance négative) était supérieure à 95 %, ce qui indique que les deux types d'échantillons peuvent être utilisés pour le diagnostic du patient (Tableau 27 et Tableau 28).

Tableau 27 : Tableau de la concordance entre le sang périphérique et la moelle osseuse

Sang périphérique	Moelle osseuse	
	+	-
+	91	1
-	2	90
Total	93	91

Tableau 28 : Concordance entre le sang périphérique et la moelle osseuse

Mesure de la concordance	Pourcentage de concordance	IC à 95 % ⁽¹⁾
Concordance positive moyenne	98,4 %	(96,2 %, 100,0 %)
Concordance négative moyenne	98,4 %	(96,2 %, 100,0 %)

⁽¹⁾L'intervalle de confiance (IC) à 95 % a été calculé à l'aide d'une méthode de bootstrap non paramétrique.

17.8. Conclusions (IVS-002-001)

- 17.8.1. Dans l'ensemble, les résultats démontrent que le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay identifie la même population de patients atteints de LAM que celle incluse dans l'essai clinique A2301 en ce qui concerne les mutations ITD et TKD du gène *FLT3*.
- 17.8.2. Les données de cette étude étayent la garantie raisonnable de sécurité et d'efficacité du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay lorsque ce dernier est utilisé selon les indications d'utilisation.

17.9. Présentation de l'étude (IVS-056-001)

- 17.9.1. Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay a été développé par Invivoscribe et est approuvé par la FDA en tant que test diagnostique compagnon à utiliser pour faciliter l'évaluation des patients atteints d'une leucémie aiguë myéloïde (LAM). Afin de démontrer l'utilité clinique de ce test diagnostique compagnon (CDx), les patients ont fourni leur consentement éclairé pour l'analyse de leur échantillon avec le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay en vue de leur inclusion dans une étude clinique pivot (étude de phase III 2215-CL-0301 évaluant l'efficacité d'ASP2215). Les deux types de mutations du gène *FLT3* détectés par le test CDx *FLT3* sont les duplications internes en tandem (ITD) et les mutations du domaine de la tyrosine kinase (TKD).
- 17.9.2. Pour évaluer l'exactitude du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, une méthode de séquençage de nouvelle génération utilisant la plateforme MiSeq d'Illumina a fait office de source indépendante d'informations sur la séquence pour les mutations ITD et TKD. La procédure de test de la méthode de référence a été développée et validée par Invivoscribe pour la capacité à évaluer la présence ou l'absence de mutations ITD et TKD dans le gène *FLT3*. Le test a ensuite été utilisé pour évaluer l'exactitude du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay en utilisant l'ADN extrait d'échantillons biologiques collectés pendant la période de sélection et d'inclusion de l'étude 2215-CL-0301.

17.10. Objectifs de l'étude (IVS-056-001)

- 17.10.1. Lors de l'analyse finale, le co-objectif principal de l'étude était d'estimer l'efficacité du fumarate de gilteritinib dans la population positive avec le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay via un test de log-rank stratifié de la survie globale.
- 17.10.2. L'objectif de l'étude de la méthode de référence est d'évaluer de manière indépendante la présence ou l'absence de mutations du gène *FLT3* à l'aide de la plateforme de séquençage de nouvelle génération MiSeq d'Illumina afin de confirmer l'exactitude du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. L'objectif de cette étude est décrit dans la section Objectif secondaire du protocole, Étude pivot du test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay pour le composé ASP2215.

17.11. Population de patients (IVS-056-001)

- 17.11.1. Lors de l'analyse finale, 771 échantillons issus de 633 sujets ont été analysés avec le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. 371 sujets ont été inclus dans la population en intention de traiter finale. Cinq sujets négatifs avec le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay et inclus dans l'étude en se basant sur un test *FLT3* local ont été exclus de l'ensemble d'analyse intégral (FAS). Par conséquent, 366 sujets randomisés dans l'étude ont été utilisés dans l'ensemble d'analyse intégral pour l'analyse finale.

17.12. Sélection des échantillons pour le test par la méthode de référence (IVS-056-001)

- 17.12.1. Un échantillon a été sélectionné par sujet pour le test par la méthode de référence. Les échantillons dont le volume était insuffisant pour être testés par la méthode de référence ont été exclus de l'étude. Au total, 467 échantillons ont été testés par la méthode de référence.

17.13. Analyse de la sécurité (IVS-056-001)

- 17.13.1. Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay ne devrait pas causer directement d'effets indésirables réels ou potentiels, mais les résultats du test peuvent avoir un impact direct sur les risques associés au traitement du patient.

17.14. Efficacité (IVS-056-001)

- 17.14.1. Lors de l'analyse finale, la survie globale médiane du bras sous fumarate de gilteritinib était plus longue (9,3 mois) que celle du bras sous chimiothérapie de rattrapage (5,6 mois) dans la population CDx+. Le hazard ratio (HR) stratifié par le modèle de régression de Cox était estimé à 0,637 (IC à 95 % 0,488, 0,830) pour la chimiothérapie de rattrapage, valeur *p* (unilatérale, log-rank stratifié) = 0,0004, ce qui correspond à une diminution du risque relatif de décès en faveur du fumarate de gilteritinib. La courbe de Kaplan-Meier est présentée à la Figure 11.

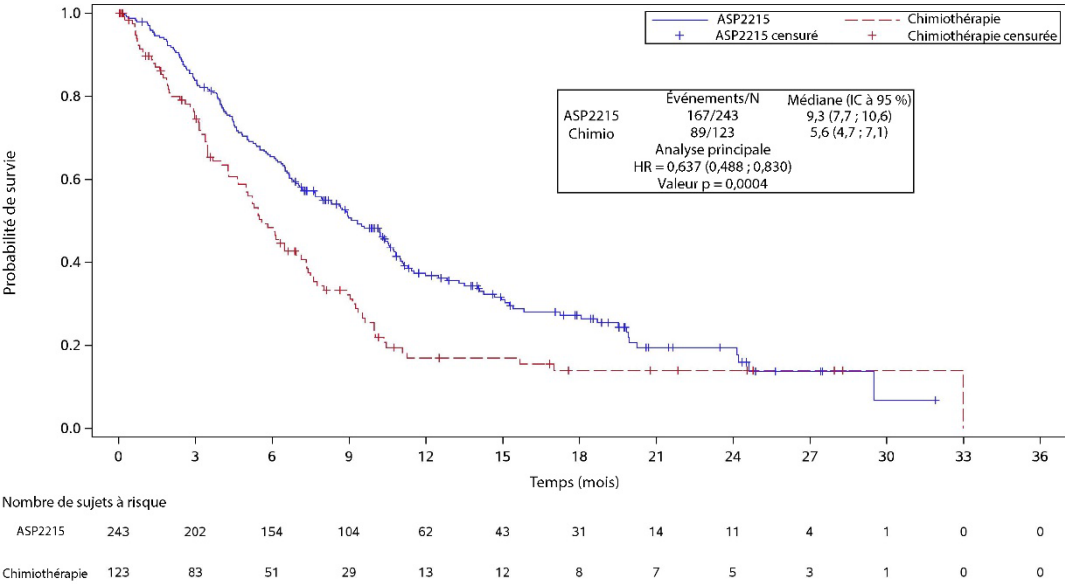


Figure 11 - Courbe de Kaplan-Meier de la survie globale.

17.14.2. Le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay était en concordance avec la méthode de référence. La concordance globale était élevée (97,2 %). La limite inférieure de l'IC à 95 % du pourcentage de concordance globale est supérieure à 90 %, ce qui montre une concordance entre le test de mutation CDx *FLT3* et le test de séquençage sur la plateforme MiSeq.

Tableau 29 : Concordance entre le test CDx et le séquençage sur la plateforme MiSeq

Concordance	Pourcentage de concordance (n)	IC à 95 % ⁽¹⁾
% de concordance positive	100 % (300/300)	(98,8 %, 100 %)
% de concordance négative	92,0 % (150/163)	(86,7 %, 95,7 %)
% de concordance globale	97,2 % (450/463)	(95,2 %, 98,5 %)

⁽¹⁾L'intervalle de confiance (IC) à 95 % est calculé à l'aide de la méthode dite exacte de Clopper-Pearson.

Les estimations ponctuelles du pourcentage de concordance positive, du pourcentage de concordance négative et du pourcentage de concordance globale pour les mutations TKD sont respectivement de 100 %, 99,3 % et 99,4 %.

Tableau 30 : Tableau de contingence entre le test CDx et le séquençage sur la plateforme MiSeq pour les mutations ITD

CDx	MiSeq		Total
	MiSeq+	MiSeq-	
CDx+	270	14	284
CDx-	0	180	180
Total	270	194	464

Tableau 31 : Tableau de contingence entre le test CDx et le séquençage sur la plateforme MiSeq pour les mutations TKD

CDx	MiSeq		Total
	MiSeq+	MiSeq-	
CDx+	32	3	35
CDx-	0	431	431
Total	32	434	466

17.15. Conclusions (IVS-056-001)

- 17.15.1. Lors de l'analyse finale, 366 sujets ont été inclus dans l'ensemble d'analyse intégral (FAS). La survie globale médiane du bras sous fumarate de gilteritinib était plus longue (9,3 mois) que celle du bras sous chimiothérapie de rattrapage (5,6 mois) dans la population CDx+. Le hazard ratio (HR) stratifié par le modèle de régression de Cox était estimé à 0,637 (IC à 95 % 0,488, 0,830) pour la chimiothérapie de rattrapage, valeur p (unilatérale, log-rank stratifié) = 0,0004, ce qui correspond à une diminution du risque relatif de décès en faveur du fumarate de gilteritinib.
- 17.15.2. Pour le test par la méthode de référence, le critère d'acceptation de l'étude était respecté : la limite inférieure de l'IC à 95 % exact bilatéral (Clopper-Pearson) du pourcentage de concordance globale dépassait 90 %. La concordance entre le test de mutation LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay et la méthode de référence de séquençage de nouvelle génération sur la plateforme MiSeq a pu être établie.

18. Références bibliographiques

- Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, Gieger T, Copper LC, Smith BD, Small D and Berg KD. Detection of *FLT3* Internal Tandem Duplication and D835 Mutations by a Multiplex Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis Assay. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2003, 5:96-102.
- Yamamoto, Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Koda Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of *FLT3* in human hematologic malignancies. *Blood*, 2001, 97(8):2434-9.

19. Support technique et service client

Coordonnées



Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | États-Unis

Téléphone: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Heures d'ouverture: 7 h – 17 h heure du Pacifique

Service technique: support@invivoscribe.com | Service client: sales@invivoscribe.com | Site internet: www.invivoscribe.com

Les représentants du support technique et du service client sont disponibles du lundi au vendredi pour répondre à vos questions par téléphone, par e-mail ou sur le site Internet.

20. Symboles

Les symboles suivants sont utilisés pour l'étiquetage des produits de diagnostic d'Invivoscribe :

	Numéro de référence		Date de péremption
	Volume du réactif		Représentant agréé dans la Communauté européenne
	Numéro de lot		Consulter les instructions d'utilisation
	Conditions de conservation		Destiné au diagnostic <i>in vitro</i>
	Identifiant Unique de L'Appareil		Fabricante
	Conformité Britannique Évaluée		Personne responsable au Royaume-Uni
	Mandataire Suisse		Conformité Européenne

21. Informations légales

En attente d'octroi de brevet.

Ce produit est un produit de diagnostic *in vitro*. Non disponible à la vente ou à l'utilisation en Amérique du Nord.

L'utilisation de ce produit peut nécessiter des méthodes d'amplification des acides nucléiques telles que l'amplification en chaîne par polymérase (PCR). Les licences nécessaires à la pratique des méthodes d'amplification ou à l'utilisation des enzymes d'amplification ou d'équipements couverts par les brevets de tiers relèvent de la responsabilité de l'utilisateur, et aucune de ces licences n'est accordée par Invivoscribe, Inc., expressément ou implicitement.

LeukoStrat® est une marque déposée d'Invivoscribe, Inc.

RYDAPT® est une marque déposée de Novartis AG.

LIZ®, Life Technologies®, GeneMapper®, GeneScan™, POP-7™, Veriti™, Hi-Di™, LIZ™ et NanoDrop™ sont des marques déposées de Thermo Fisher Scientific.

eLINE® est une marque déposée de Sartorius.

QIAamp® et QIAcube® sont des marques déposées de Qiagen.

©2024 Invivoscribe, Inc. Tous droits réservés. Les marques commerciales mentionnées dans ce document sont la propriété d'Invivoscribe, Inc. et/ou de ses filiales, ou (en ce qui concerne les marques commerciales d'autres détenteurs utilisées dans ce document) de leurs détenteurs respectifs.