

Mode d'emploi



IdentiClone[®] Dx

IGH Assay

IVD Destiné au diagnostic *in vitro*.

Référence catalogue

REF 91010101

Produit(s)

IdentiClone Dx IGH Assay

UDI

00810022732502

Quantité

33 réactions

Conditions de conservation


-30°C  -15°C

Table des matières

1.	UTILISATION PREVUE	3
2.	INDICATIONS/CONTRE-INDICATIONS	3
3.	GLOSSAIRE ET ABBREVIATIONS	3
3.1.	Glossaire	3
3.2.	Abréviations	4
4.	RESUME ET EXPLICATION DU TEST	5
4.1.	Contexte	5
4.2.	Résumé	5
5.	PRINCIPES DE LA PROCEDURE	6
5.1.	Amplification en chaîne par polymérase (PCR)	6
5.2.	Détection par fluorescence	6
5.3.	Analyse logicielle	6
5.4.	Utilisateur final et environnement d'utilisation	7
6.	REACTIFS	7
6.1.	Composants du réactif	7
6.2.	Conservation et manipulation des réactifs	8
6.3.	Avertissements et précautions	8
6.4.	Réactifs, matériaux et équipement	9
7.	PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	11
7.1.	Précautions	11
7.2.	Substances interférentes	11
7.3.	Exigences et stabilité des échantillons	11
7.4.	Préparation des échantillons	11
7.5.	Conservation des échantillons	11
8.	PROCEDURE DE TEST	12
8.1.	Préparation du mélange mère	13
8.2.	Amplification PCR	14
8.3.	Préparation de la plaque de détection	14
8.4.	Installer les paramètres du test	15
8.5.	Analyse des fragments par électrophorèse capillaire	18
8.6.	Contrôle qualité	20
9.	INTERPRETATION DES RESULTATS	21
9.1.	Points de contrôle du logiciel	21
10.	RETESTER, LE CAS ECHEANT	22
10.1.	Analyses non valides	22
10.2.	Échantillons non valides au sein de séries valides	22
10.3.	Détails d'échec et répétition des tests	23
11.	LIMITES DE LA PROCEDURE	23
12.	CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE	24
12.1.	Validations des échantillons – Stabilité des échantillons	24
12.2.	Seuil clinique	25
12.3.	Sensibilité analytique : Limite de blanc (LdB)	26
12.4.	Sensibilité analytique : Limite de détection (LdD)	27
12.5.	Spécificité analytique : Substances interférentes	29
12.6.	Spécificité analytique : Contamination par transfert/contamination croisée	30
12.7.	Spécificité analytique : Étude de précision intra-laboratoire	31
12.8.	Précision de la mesure : Étude de reproductibilité multisites	32
12.9.	Validation du flux de travail du test : Étude d'extraction d'ADN	33
12.10.	Validation du flux de travail du test : Étude de l'ADN de départ	35
12.11.	Validation du flux de travail du test : Équivalence : 3500xL contre 3500xL Dx	36
12.12.	Validation clinique	37
13.	BIBLIOGRAPHIE	40
14.	SUPPORT TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT	40
15.	SYMBLES	41
16.	INFORMATIONS LEGALES	41
17.	HISTORIQUE DES REVISIONS	41

1. Utilisation prévue

Le test IdentiClone Dx *IGH* Assay (« Test ») est un dispositif de diagnostic *in vitro* destiné à la détection de la clonalité par électrophorèse capillaire dans les réarrangements du gène de chaîne lourde des immunoglobulines (*IGH*) dans les échantillons de sang périphérique comme méthode complémentaire pour le diagnostic des patients suspectés d'être atteints d'une maladie lymphoproliférative à cellules B.

Les résultats positifs (c.-à-d., la détection de la clonalité) ne doivent pas être le seul critère pour déterminer la présence de la maladie. Des résultats négatifs n'excluent pas une maladie lymphoproliférative. L'utilisation d'analyses biologiques supplémentaires (p. ex., numération des globules blancs [GB], morphologie, immunohistochimie, détection des mutations excitatrices, cytométrie en flux, etc.) et le tableau clinique doivent être pris en compte dans le diagnostic final de la maladie lymphoproliférative.

Ce test qualitatif non automatisé est destiné à être utilisé sur les analyseurs génétiques ABI 3500xL Dx et ABI 3500xL Genetic Analyzer.

2. Indications/contre-indications

Aucune contre-indication n'est identifiée.

3. Glossaire et abréviations

3.1. Glossaire

Tableau 1. Glossaire des termes spécifiques au test IdentiClone Dx *IGH* Assay

Terme	Définition
Amplicon	Copies multiples du fragment d'ADN créé par amplification (p. ex., PCR).
Amplification	Faire plusieurs copies d'un gène ou d'une séquence d'ADN (p. ex., PCR).
Artefact	Un pic rouge détecté par l'analyse de fragments sur l'analyseur génétique ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer qui se trouve à moins de 0,5 paire de bases des 5 pics bleus ou verts les plus élevés. Si le pic d'artefact est supérieur ou égal au pic bleu ou vert associé, le résultat du mélange mère (MM) associé sera considéré comme non valide.
Clan	Les réarrangements du gène <i>IGH</i> sont identifiés par le test IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay en utilisant des amorces ciblant les 7 gènes de sous-groupe IGHV, IGHV1-7. Les gènes des sous-groupes IGHV peuvent être classés plus en clans de gène IGHV (Clan I, II et III) en fonction de leur similitude de séquence. ¹⁵ Le Clan I inclut les gènes des sous-groupes IGHV1, IGHV5 et IGHV7, le clan II comprend les gènes des sous-groupes IGHV2, IGHV4 et IGHV6, et le clan III comprend le gène des sous-groupes IGHV3.
Clonal	<ul style="list-style-type: none"> Un résultat <i>Sample ID</i> (<i>ID de l'échantillon</i>) (définition globale) dans lequel la clonalité est détectée. Résultat de <i>Sample Name</i> (<i>Nom de l'échantillon</i>) (pour un MM) dans lequel un pic significatif est détecté dans la plage de taille valide.
Détection	Partie du test dans laquelle les amplicons sont séparés par électrophorèse capillaire et détectés comme des pics.
<i>In vitro</i>	Se produit en dehors d'un organisme vivant.
Indéterminé	Un résultat d'échantillon dans lequel les 3 résultats du mélange mère (MM) ont produit des résultats indéterminés ; ou un résultat de MM d'échantillon dans lequel la présence ou l'absence de clonalité ne peut pas être déterminée (c.-à-d., résultat ambigu)
Non valide	Un résultat d'échantillon dans lequel les 3 résultats du mélange mère sont non valides ; ou un résultat de MM d'échantillon qui ne répond pas aux critères de validité (voir Tableau 8).
Maladie lymphoproliférative	Trouble caractérisé par la prolifération anormale des lymphocytes.
Produit du mélange mère	Amplicons générés par l'amplification de 3 MM différents : Tube <i>IGH</i> A (FR1) MM, tube <i>IGH</i> B (FR2) MM, tube <i>IGH</i> C (FR3) MM.
Contrôle négatif	Solution tampon contenant de l'ADN polyclonal ; ce contrôle devrait produire un <i>résultat Non-clonal</i> (<i>Non clonal</i>) avec chaque mélange mère.
Non clonal	Un résultat d'échantillon dans lequel la clonalité n'est pas détectée ; ou un résultat MM d'échantillon dans lequel un pic significatif n'est pas détecté dans la plage de taille valide.

Tableau 1. Glossaire des termes spécifiques au test IdentiClone Dx *IGH* Assay

Terme	Définition
Plan de plaque	Représentation visuelle d'une plaque de détection, importée dans l'analyseur génétique ABI. Ce fichier fournit une disposition de plaque à 96 puits contenant les informations de série associées, y compris le <i>Sample ID</i> , le <i>Sample Name</i> , le <i>Sample Type (Type d'échantillon)</i> et le <i>Master Mix (Mélange mère)</i> pour chaque emplacement de puits.
Contrôle positif	Solution tampon contenant de l'ADN utilisée pour évaluer la validité du test ; ce contrôle devrait produire un résultat Clonal avec chaque mélange mère.
Sample ID	Identification unique associée à un échantillon patient. Chaque <i>Sample ID</i> doit être testé avec chaque mélange mère (N = 3) inclus dans le test. Le <i>Sample Name</i> est indiqué par le mélange mère individuel et les résultats de test spécifiques à la série. Chaque <i>Sample ID</i> aura au moins 3 résultats associés au nom de l'échantillon. Voir la Figure 10 pour un exemple.
Sample Name	Identification unique associée au mélange mère et aux résultats de test spécifiques à la série associés à un <i>Sample ID (échantillon patient)</i> . Voir la Figure 10 pour un exemple.
Saturation	Présence d'un pic avec un RFU trop élevé ($\geq 30\ 000$)
Erreur de qualité de la taille (QT)	Un analyseur génétique ABI 3500xL ou ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer a déterminé une erreur dans laquelle la similitude calculée entre le schéma de fragment du colorant standard de taille spécifique et la distribution observée des pics de l'étalon de taille dans un échantillon n'a pas dépassé le seuil prédéterminé.
Pic significatif	Un pic dominant dans une plage de taille valide.

3.2. Abréviations

Tableau 2. Définitions des abréviations

Acronyme	Définition
bp	Paire de bases
EC	Électrophorèse capillaire : méthode électrocinétique utilisée pour séparer les amplicons par taille.
IC	Intervalle de confiance
ADN	Acide désoxyribonucléique
FNC	File Name Convention (Convention de nommage) : cadre pour nommer les fichiers d'une manière qui décrit leur contenu et leur lien avec d'autres fichiers.
FSA	Fichier de données d'analyse de fragments créé par l'instrument d'électrophorèse capillaire.
ADNg	ADN génomique
IFU	Mode d'emploi
<i>IGH</i>	Immunoglobulin heavy chain gene (Gène d'immunoglobuline à chaînes lourdes)
<i>IGHFR1/2/3</i>	Les régions charpentes préservées 1, 2 et 3 du gène <i>IGH</i>
IUO	Investigational Use Only (Réservé à un usage expérimental)
DIV	Diagnostic <i>in vitro</i>
LI	Limite inférieure
LdB	Limite de blanc
LdD	Limite de détection
MM	Mélange mère
S. O.	Sans objet
NTC	No template control (Contrôle sans matrice) (eau) ; ce contrôle ne devrait générer aucun pic amplifié dans la plage de taille valide.
PCN	Pourcentage de concordance négative
PCG	Pourcentage de concordance globale

Tableau 2. Définitions des abréviations

Acronyme	Définition
SP	Sang périphérique
PCR	Amplification en chaîne par polymérase
PCP	Pourcentage de concordance positive
ASP	Accumulation de sang périphérique
RPR	Rapport des pics relatifs, la valeur utilisée pour déterminer la clonalité.
RUO	Research use only (Réservé à la recherche)
QT	Qualité de la taille : une présentation numérique de la similitude entre le motif de fragment pour le colorant standard de taille spécifié dans la définition de l'étalon de taille et la distribution réelle des pics de l'étalon de taille dans l'échantillon.
XLSX	Format de fichier compatible avec les versions d'Office 2010 et ultérieures. Ce format de fichier peut être utilisé pour créer le dossier de plaque sur les analyseurs génétiques ABI 3500xL Dx et ABI 3500xL Genetic Analyzer.
XML	Fichier de langue de balisage extensible conçu pour stocker et transporter les données. Ce format de fichier est utilisé pour les paramètres de l'instrument de test IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay, le groupe de résultats et la convention de nom de fichier pour les analyseurs génétiques ABI 3500xL Dx et ABI 3500xL Genetic Analyzer (inclus avec REF 91010111).

4. Résumé et explication du test

4.1. Contexte

Il est estimé que plus de 900 000 nouveaux cas de maladies lymphoprolifératives à cellules B sont diagnostiqués dans le monde chaque année, compte tenu de la variété des maladies qui entrent dans cette catégorie.^{1,2,3} Les troubles lymphoprolifératifs à cellules B, tels que les lymphomes et les leucémies, surviennent souvent en raison de la dérégulation des processus normaux de développement des cellules B, en particulier dans les réarrangements du gène des chaînes lourdes (*IGH*) des immunoglobulines.

Au cours de l'ontogénie dans les lymphocytes B, le gène *IGH* subit un processus appelé recombinaison V(D)J, où la variable (V_H), la diversité (D_H), et les segments de gène qui rejoignent (J_H) sont réorganisés de manière aléatoire.^{4,5} Ces segments génétiques réorganisés augmentent la diversité génétique, générant environ 10^{12} séquences d'ADN uniques, et permettent au système immunitaire de reconnaître un large éventail d'antigènes.^{4,5,6} Cependant, dans les maladies lymphoprolifératives à cellules B, un seul clone de cellule B avec un réarrangement *IGH* particulier prolifère anormalement, conduisant à une population de lymphocytes B avec des réarrangements identiques (ou clonaux) du gène *IGH*. La détection de ces expansions clonales est une caractéristique des tumeurs malignes à cellules B.^{4,5,6,7,8,9}

Lorsque la réaction en chaîne par polymérase (PCR) est appliquée à ces réarrangements de gène, des produits de longueur et de séquence uniques sont générés pour chaque cellule.^{6,7,8,9} Donc, cette méthodologie peut être appliquée pour identifier les populations de lymphocytes dérivées d'une cellule unique en identifiant les réarrangements uniques du gène V-J présents dans le locus de l'*IGH*.^{6,8,9,10} La présence de réarrangements clonaux de l'*IGH* est utilisée pour confirmer le diagnostic des maladies lymphoprolifératives des lymphocytes B, faisant la distinction entre les proliférations lymphoïdes malignes et les proliférations lymphoïdes bénignes.^{11,12,13,14}

4.2. Résumé

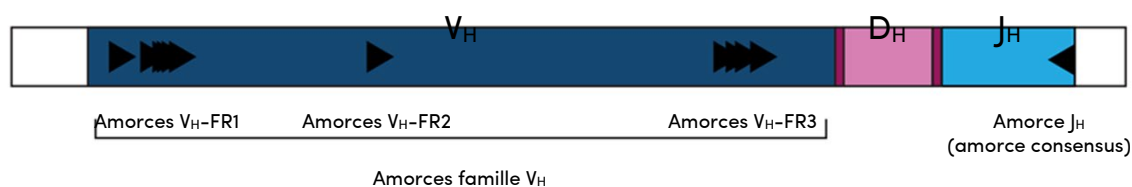
Le test IdentiClone Dx *IGH* Assay comprend trois mélanges mères (MM) PCR, un contrôle positif (*IGH* POS [+]), un contrôle négatif (NEG [-]), un contrôle sans matrice (NTC), de l'ADN polymérase Taq et le progiciel IdentiClone Dx *IGH* Software. Les mélanges mères de test utilisent plusieurs amorces consensus couplées à un marqueur fluorescent, conçues pour cibler les régions charpentes préservées (FR1, 2 et 3) dans les régions V_H et J_H du locus *IGH*. Après l'amplification, les amplicons marqués au fluorophore sont fractionnés par taille, générant des profils d'amplicons avec chaque mélange mère PCR. Les données résultantes sont ensuite téléchargées dans le logiciel IdentiClone Dx *IGH* Software pour analyse afin de déterminer la validité et l'état de clonalité. Les résultats valides de chaque mélange mère sont compilés pour établir l'état de clonalité de chaque échantillon : Clonal, Non clonal, Non valide ou Indéterminé.

5. Principes de la procédure

5.1. Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

La région variable (V_H) étant sujette à des mutations somatiques, il est difficile d'utiliser un seul ensemble d'amorces PCR pour cibler toutes les régions conservées de part et d'autre des réarrangements de V_H - J_H . Pour cette raison, le test IdentiClone Dx *IGH* Assay utilise plusieurs amorces consensus de PCR qui ciblent trois régions charpentes (FR1, FR2 et FR3) et la région J_H du gène *IGH*. Les amorces consensus sont conjuguées à des colorants fluorescents et contenues dans trois mélanges mères individuels : MMA, MMB et MMC. (Figure 1) Ces mélanges mères amplifient les trois régions charpentes (Framework Regions, FR) et les deux régions déterminant la complémentarité (Complementarity-determining regions, CDR) à partir d'ADN génomique (ADNg) isolé à partir d'un échantillon de sang périphérique.

Figure 1. Organisation d'un gène à chaînes lourdes d'immunoglobuline réorganisé sur le chromosome 14. Les flèches noires représentent les positions relatives des amorces qui ciblent la région charpente préservée (FR1/2/3) et les segments de gène J_H consensus en aval. Les produits d'amplification générés par chacune de ces régions peuvent être détectés lorsque des jeux d'amorces fluorescentes sont utilisés avec des instruments d'électrophorèse capillaire ayant recours à la détection par fluorescence.



MMA	<i>IGH</i> FR1	amorce + J_H (amorce consensus)
MMB	<i>IGH</i> FR2	amorce + J_H (amorce consensus)
MMC	<i>IGH</i> FR3	amorce + J_H (amorce consensus)

5.2. Détection par fluorescence

Après l'amplification, chaque produit de PCR est traité sur un analyseur génétique ABI 3500xL Dx ou ABI 3500xL Genetic Analyzer, dans lequel les amplicons marqués au fluorophore sont fractionnés par taille. Les paramètres de série spécifiques au test, tels que les paramètres de l'instrument, le groupe de résultats et la convention de dénomination de fichier, sont inclus sous forme de fichiers XML dans le progiciel IdentiClone Dx *IGH* Software et doivent être configurés avant d'effectuer le test pour la première fois. Une fois configurés, les profils d'amplicon de chaque mélange mère de PCR sont collectés au format de fichier FSA et téléchargés dans le logiciel IdentiClone Dx *IGH* Software pour interprétation.

5.3. Analyse logicielle

Le logiciel IdentiClone Dx *IGH* Software est conçu pour compléter le test IdentiClone Dx *IGH* Assay et éliminer la subjectivité de l'interprétation de l'électrophérogramme. Les fichiers de données brutes générés par les amplicons du test avec détection de fluorescence sont analysés en termes de validité et d'état de clonalité tout en se référant à un plan de plaque configuré pour la traçabilité de l'échantillon.

Comme ce test nécessite trois mélanges mères pour déterminer l'état de clonalité, une hiérarchie de dénomination est utilisée pour corréliser les résultats du mélange mère, identifiés par un *Sample Name*, avec l'échantillon du patient, qui est identifié par un *Sample ID* (voir Figure 9). Chaque ensemble de tests de mélange mère, comprenant des échantillons, un contrôle positif, un contrôle négatif et un contrôle sans matrice, compose une « série » et peut être configuré individuellement à l'aide de la fonction Plate Setup (Configuration de la plaque) du logiciel et chargé sur la même plaque, contenant des séries supplémentaires. Une fois la détection terminée, les fichiers de données sont téléchargés dans le logiciel qui procède à l'analyse en se référant au plan de plaque pour terminer l'analyse intermédiaire pour ce mélange mère. Si les séries des trois mélanges mères sont jugées valides, les données sont traitées pour générer des résultats intermédiaires, représentés par des *Sample Names (Noms des échantillons)*, qui sont affichés pour que l'utilisateur puisse choisir et générer l'état de clonalité pour chaque *Sample ID*. Pour plus de détails, consulter le mode d'emploi correspondant du logiciel IdentiClone Dx *IGH* Software.

5.4. Utilisateur final et environnement d'utilisation

- 5.4.1. Le dispositif est réservé à un usage professionnel au sein d'un laboratoire d'analyses cliniques.
 5.4.2. Le dispositif n'est pas destiné aux tests à proximité du patient ni aux autotests.
 5.4.3. Le dispositif n'est pas un test de diagnostic complémentaire.

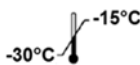

6. Réactifs

6.1. Composants du réactif

Tableau 3. Kits disponibles

Référence catalogue	Description	Quantité
REF 91010101	IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay	33 réactions

Tableau 4. Composants des réactifs (composants du kit)

Réactif	Référence	Composants du réactif (substances actives)	Quantité unitaire	Nbre d'unités	Température de conservation
Mélanges mères	REF 21010191	MMA <i>IGH</i> FR1 Oligonucléotides multiples ciblant la région charpente 1 du gène de chaîne lourde de l'immunoglobuline en solution saline tamponnée.	1 500 µl	1	 -30°C -15°C
	REF 21010201	MMB <i>IGH</i> FR2 Oligonucléotides multiples ciblant la région charpente 2 du gène de chaîne lourde de l'immunoglobuline en solution saline tamponnée.	1 500 µl	1	
	REF 21010211	MMC <i>IGH</i> FR3 Oligonucléotides multiples ciblant la région charpente 3 du gène de chaîne lourde de l'immunoglobuline en solution saline tamponnée.	1 500 µl	1	
ADN de contrôle positif <i>IGH</i>	REF 40883460	CONTROL + <i>IGH</i> ADNg à partir de cellules cultivées dans une solution saline tamponnée	100 µl	1	
ADN de contrôle négatif	REF 40920070	CONTROL - ADNg à partir de cellules cultivées dans une solution saline tamponnée	100 µl	1	
Contrôle sans matrice (NTC)	REF 40930010	CONTROL NTC Eau	100 µl	1	
ADN polymérase FalconTaq®	REF 60970150	TAQ Enzyme polymérase ADN FalconTaq	50 µl	1	
Progiciel IdentiClone Dx <i>IGH</i> Software	REF 91010111	IdentiClone Dx <i>IGH</i> Software <ul style="list-style-type: none"> IdentiClone-Dx-<i>IGH</i>-Software-1.2.x.IVD.msi Paramètres du test IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay <ul style="list-style-type: none"> <i>IGH_IP.xml</i> <i>IGH_FNC.xml</i> <i>IGH_RG.xml</i> 	1 progiciel	1	 15°C 30°C

6.2. Conservation et manipulation des réactifs

- 6.2.1. Si les kits de test ne sont pas utilisés immédiatement, **ils doivent être conservés entre -30 °C et -15 °C.**
 - 6.2.1.1. Conserver les mélanges mères de PCR dans l'obscurité pour protéger les amorces marquées au fluorophore.
- 6.2.2. Lors de l'ouverture du kit de test, inspecter visuellement chaque réactif pour détecter tout dommage et/ou fuite.
- 6.2.3. Décongeler et mélanger soigneusement tous les réactifs et contrôles au vortex avant utilisation pour s'assurer qu'ils sont complètement remis en suspension et homogènes.

IMPORTANT ! Un vortexage excessif peut endommager l'ADN et faire perdre leurs fluorophores aux amorces marquées. Ne PAS mélanger au vortex le tube contenant de l'ADN polymérase Taq.

- 6.2.3.1. Mélanger au vortex à vitesse maximale pendant 5 à 15 secondes.
- 6.2.3.2. Centrifuger pendant 2 à 5 secondes.
- 6.2.3.3. Lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions, les matériaux ouverts restent stables pendant 6 mois ou 5 cycles de congélation-décongélation, ou jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.

6.3. Avertissements et précautions

IVD Ce produit est réservé à un usage professionnel.

- 6.3.1. Ce kit de test forme un système qui doit être utilisé tel quel. Ne pas remplacer les réactifs par ceux d'autres fabricants. 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.
- 6.3.2. Le respect du protocole garantit une performance optimale et une bonne reproductibilité. Veiller à utiliser le programme du thermocycleur adéquat, les autres programmes pouvant donner des résultats erronés/faussés, comme des faux positifs et des faux négatifs.
- 6.3.3. Éliminer les réactifs non utilisés et les déchets conformément aux règlements en vigueur dans votre pays.
- 6.3.4. Ne pas mélanger ou combiner les réactifs de kits comportant des numéros de lots différents.
- 6.3.5. Le personnel de laboratoire doit porter un équipement de protection individuelle (EPI) approprié, et suivre les bonnes pratiques de laboratoire et les précautions universelles lors de la manipulation des échantillons. Toujours manipuler les échantillons dans des installations de confinement de sécurité biologique approuvées et ouvrir les récipients uniquement dans une enceinte de sécurité biologique certifiée.
- 6.3.6. En raison de la sensibilité analytique de ce test, prendre de très grandes précautions pour éviter de contaminer les réactifs et/ou les mélanges d'amplification avec des échantillons, des contrôles ou des produits d'amplification. Contrôler tous les réactifs pour détecter tout signe de contamination (p. ex. contrôles négatifs donnant des signaux positifs). Éliminer les réactifs suspectés d'être contaminés.
- 6.3.7. Afin de limiter 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 la PCR.
- 6.3.8. L'autoclavage ne permet pas d'éliminer l'ADN issu d'une contamination.
- 6.3.9. La progression du travail dans le laboratoire réalisant la PCR doit toujours se faire en sens unique entre des zones de travail séparées : commencer par la préparation des mélanges mères, suivie de la préparation des échantillons, puis de l'amplification et terminer par la détection. Ne pas amener d'amplicons (c.-à-d. la plaque PCR après l'amplification) dans les zones désignées pour le mélange mère ou la préparation des échantillons.
- 6.3.10. Conserver toutes les pipettes et les pointes de pipette ainsi que tout le matériel utilisé dans un endroit spécifique dédié à cette zone du laboratoire.
- 6.3.11. Utiliser des consommables en plastique stériles et jetables dans la mesure du possible pour éviter toute contamination par des RNase, DNase ou une contamination croisée.
- 6.3.12. Une fois le sachet en polymère POP-7 équilibré à température ambiante, examiner l'intérieur du col au point d'installation. Vérifier que le sachet ne présente pas de polymère sec ou cristallisé. Ne pas installer le sachet sur l'instrument ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer si des cristaux sont présents, car ceux-ci pourraient avoir un impact sur les performances du test et/ou de l'instrument. Contacter le service clientèle de Thermo Fisher Scientific.
- 6.3.13. Tout incident grave, survenu en lien avec le dispositif doit être signalé au fabricant et aux autorités compétentes dans l'État membre de l'utilisateur et/ou du patient.

6.4. Réactifs, matériaux et équipement

Entretien tout le matériel conformément aux instructions du fabricant. Le Tableau 5 répertorie les réactifs, matériels et équipements nécessaires non fournis dans le kit.

Tableau 5. Réactifs, matériel et équipement nécessaires (non fournis)

Réactif/Matériel/ Équipement	Fournisseurs et réactifs/matériaux/équipement recommandés	Remarques
Barrettes à 8 bouchons	S. O.	Exemptes de RNase, DNase, DNA, inhibiteur de PCR
Septums à 96 puits	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Septums pour analyseurs génétiques 3500xL Dx Genetic Analyzer, 96 puits Septums pour plaques à 96 puits, pour 3500/SeqStudio™ Flex 	S. O.
Film d'aluminium adhésif pour étanchéité de plaque	S. O.	Exemptes de RNase, DNase
Réceptacle de tampon anode	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Réceptacle de tampon anode pour analyseurs génétiques 3500 Dx/3500xL Genetic Analyzer Réceptacle de tampon anode (ABC), pour 3500/SeqStudio Flex 	Exemptes de RNase, DNase
Pipettes calibrées	S. O.	Précision requise pour mesurer des volumes allant de 1 µl à 1 000 µl.
Réseau capillaire	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> 3500xL Dx Genetic Analyzer 24-Capillary Array 50 cm 3500xL Genetic Analyzer 24-Capillary Array 50 cm 	S. O.
Instrument d'électrophorèse capillaire	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> (UE) Analyseur génétique Dx 3500xL Dx Genetic Analyzer avec logiciel de collecte de données 3500 Dx Series 3 IVD v3.0 (États-Unis) Analyseur génétique Dx 3500xL Dx Genetic Analyzer avec logiciel de collecte de données 3500 Dx Series 3 IVD v3.2 Analyseur génétique 3500xL Genetic Analyzer avec logiciel de collecte des données v1.0 Série 3500 	S'assurer que l'instrument est calibré avec le kit DS-33 Matrix Standard (set de Teinte G5) avec le GeneScan 600 LIZ Size Standard v2.0
Réceptacle de tampon cathodique	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Réceptacle de tampon cathodique pour analyseurs génétiques 3500 Dx/3500xL Genetic Analyzer Réceptacle de tampon cathodique (CBC), pour 3500/SeqStudio Flex 	S. O.
Septums du tampon cathodique	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Septums pour réceptacle de tampon cathodique pour analyseurs génétiques 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzer Septums pour réceptacle de tampon cathodique, pour 3500 et SeqStudio Flex 	S. O.
Réactif de conditionnement	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Réactif de conditionnement pour analyseurs génétiques Dx 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzer Réactif de conditionnement, pour 3500/SeqStudio Flex 	S. O.

Tableau 5. Réactifs, matériel et équipement nécessaires (non fournis)

Réactif/Matériel/ Équipement	Fournisseurs et réactifs/matériaux/équipement recommandés	Remarques
Pointes de pipette à filtre	S. O.	Stériles, exemptes de RNase/DNase/aprogène
Hi-Di Formamide	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Hi-Di™ Formamide, Série 3500 Dx Hi-Di Formamide 	S. O.
Tubes à faible adhérence	S. O.	Pour le stockage de l'ADNg ; exempt de RNase, DNase, ADN, inhibiteur de PCR
Marqueurs de taille LIZ	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> GeneScan™ 600 LIZ® taille standard v2.0 – Dx GeneScan 600 LIZ dye Size Standard v2.0 	S. O.
Microcentrifugeuse	S. O.	Stériles
Spectrophotomètre UV-Vis à microvolume	S. O.	Capable de mesurer l'absorbance à 260 nm pour le calcul de la concentration en acides nucléiques
Plaques ou tubes PCR	S. O.	Exemptes de RNase, DNase, DNA, inhibiteur de PCR
Centrifugeuse de plaques	S. O.	Centrifugeuse capable de 1 000 FCR
Polymère POP-7	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Polymère haute performance POP-7™ (384) 3500 Série Dx Polymère POP-7, pour 3500/SeqStudio™ Flex 	S. O.
Ensemble de support et socle	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Ensemble de support et socle (Standard) pour 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzer, 96 puits Ensemble de support et socle (Standard) pour 3500/3500xL Genetic Analyzer, 96 puits 	S. O.
Eau stérile	S. O.	Stérile, exempte de RNase/DNase
Thermocycleur	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Veriti™ Dx 	S. O.
Tampon Tris-EDTA (TE)	S. O.	Solution de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 et EDTA 1 mM Remarque : diluer au 1/10e avec de l'eau
Agitateur vortex	S. O.	S. O.

Contactez le fabricant pour connaître les numéros de référence des produits dans votre région.

7. Prélèvement et préparation des échantillons

7.1. Précautions

Les échantillons biologiques humains peuvent contenir des substances potentiellement infectieuses. Manipuler tous les échantillons conformément à la norme OSHA relative aux agents pathogènes transmissibles par le sang ou au niveau de sécurité biologique 2.

7.2. Substances interférentes

Les substances suivantes sont connues pour interférer avec l'amplification par PCR, à éviter si possible :

- 7.2.1. Agents chélateurs de cations divalents
- 7.2.2. Pointes de pipette à faible rétention
- 7.2.3. EDTA (non significatif à faible concentration)
- 7.2.4. Héparine

7.3. Exigences et stabilité des échantillons

Ce test nécessite au moins 0,5 ml de sang périphérique anticoagulé avec de l'EDTA.

- 7.3.1. L'échantillon peut être conservé entre 2 °C et 8 °C pendant un maximum de 7 jours avant d'être testé.
- 7.3.2. L'échantillon peut être expédié avec une poche réfrigérante ; il ne doit jamais être congelé.

7.4. Préparation des échantillons

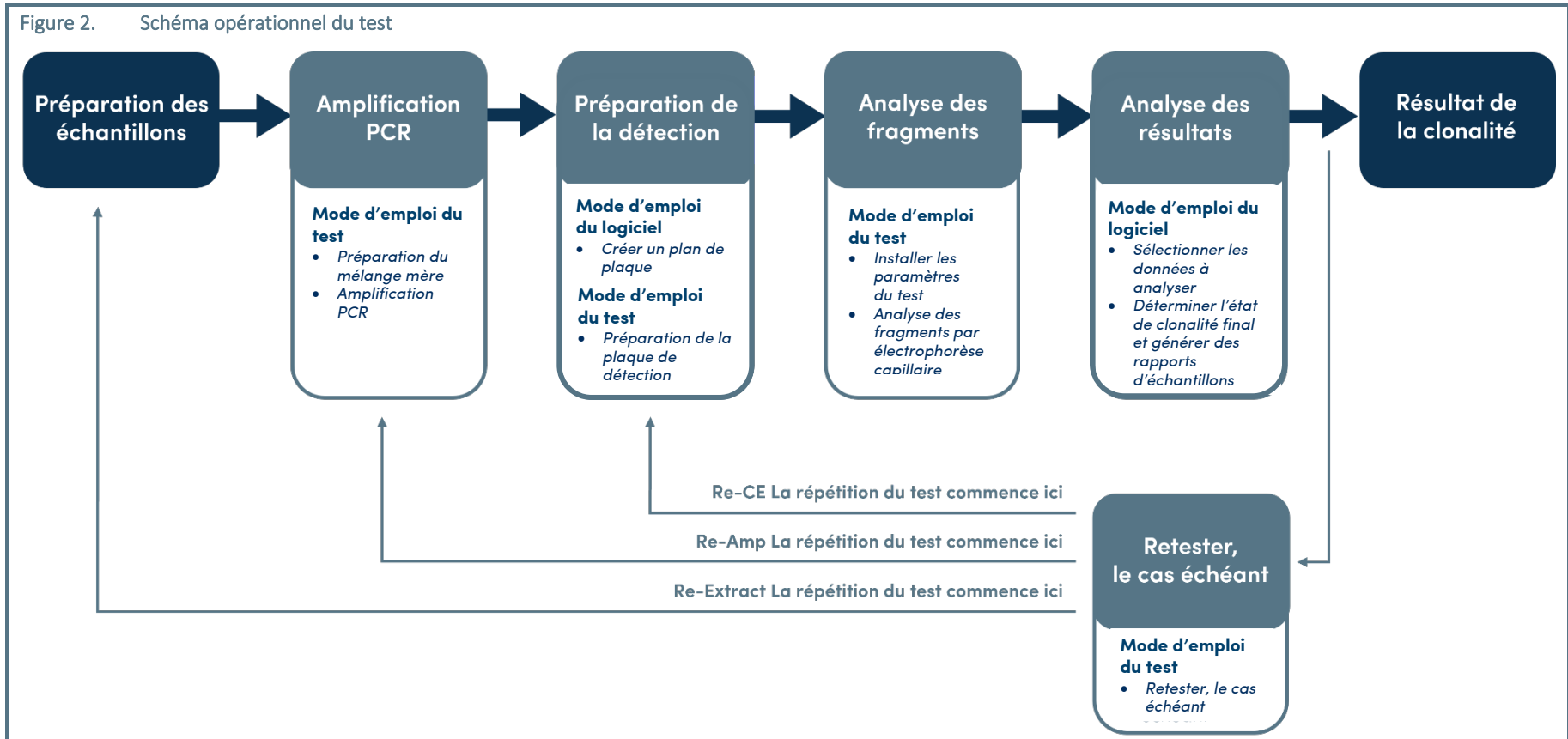
- 7.4.1. Extraire l'ADNg des échantillons < 7 jours après le prélèvement.
- 7.4.2. Quantifier l'ADNg extrait à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à microvolume.
- 7.4.3. Préparer une dilution d'ADNg dans 50 ng/μl avec 1/10e de TE.
 - 7.4.3.1. Pour l'amplification avec chaque mélange mère, 5 μl d'ADNg à une concentration de 50 ng/μl est requis.
 - Préparer au moins 15 μl à 20 μl d'ADNg dilué.
 - 7.4.3.2. Si la concentration d'ADNg disponible est < 50 ng/μl, réextraire les échantillons patients.

7.5. Conservation des échantillons

- 7.5.1. Conserver l'ADNg entre 2 °C et 8 °C pendant 7 jours au maximum avant utilisation ou entre -30 °C et -15 °C pendant 3 ans au maximum avant utilisation.
- 7.5.2. Conserver les échantillons d'ADNg dilués dans des tubes à faible adhérence.

8. Procédure de test

Remarque : Ce test nécessite l'utilisation de ce document en association avec le mode d'emploi du logiciel IdentiClone Dx IGH Software.



8.1. Préparation du mélange mère

- Inclure les contrôles de série (contrôles positif, négatif et sans modèle) avec chaque série.
 - Un réplicat d'échantillon est requis pour le test avec chaque mélange mère.
- 8.1.1. Sortir le ou les mélanges mères, le contrôle positif, le contrôle négatif, le NTC et l'échantillon d'ADNg dilué (50 ng/μl) du lieu de conservation et laisser le ou les tubes décongeler complètement à température ambiante, puis mélanger au vortex à vitesse maximale pendant environ 15 secondes
- 8.1.2. Sortir la Taq DNA Polymerase du lieu de conservation et la conserver au froid (c.-à-d. sur de la glace ou sur un bloc froid).

IMPORTANT ! Ne PAS mélanger au vortex le tube enzymatique Taq DNA Polymerase.

- 8.1.2.1. Centrifuger le ou les tubes pendant 2 à 5 secondes dans la microcentrifugeuse.

Remarque : Des étapes de centrifugation sont nécessaires pour recueillir tout le liquide au fond d'un tube ou d'un puits de plaque. Des vitesses et des durées approximatives peuvent être utilisées lorsque la réussite de la collecte est confirmée visuellement par l'utilisateur. Les vitesses et les durées indiquées sont incluses à titre de recommandation.

- 8.1.3. Utiliser les directives ci-dessous pour calculer le nombre total de réactions (N) pour chaque mélange mère :
- Inclure au moins un volume réactionnel supplémentaire pour tenir compte de l'erreur de pipetage.

n	Nbre d'échantillons
+ 1	ADN de contrôle positif (<i>IGH</i> POS (+))
+ 1	ADN de contrôle négatif (NEG (-))
+ 1	Contrôle sans matrice (NTC)
+ 1	Volume réactionnel supplémentaire
N = (n + 4)	Nbre d'échantillons + 3 contrôles + 1 volume réactionnel supplémentaire

- 8.1.3.1. Ajouter le volume calculé pour chaque mélange mère dans des tubes étiquetés distincts, en utilisant **N × 45 μl**.
- 8.1.3.2. Ajouter le volume calculé de Taq DNA Polymerase à chaque mélange mère, en utilisant **N × 0,25 μl**.
- 8.1.3.3. Mélanger au vortex le mélange mère + la ou les solutions Taq DNA Polymerase à vitesse maximale pendant 5 à 15 secondes.
- Ne PAS mélanger au vortex l'ADN polymérase Taq avant de l'ajouter à chaque mélange mère. Ne mélanger au vortex qu'après la formulation avec le mélange mère.
- 8.1.3.4. À l'aide d'une microcentrifugeuse, centrifuger les tubes entre 2 et 5 secondes.
- 8.1.4. Pour chaque réaction, combiner 45 μl de la ou des solutions d'ADN polymérase MM + Taq avec 5 μl de matrice (échantillon d'ADNg dilué dans 50 ng/μl, contrôle positif, contrôle négatif ou NTC) dans les puits individuels appropriés d'une plaque ou d'un ou de plusieurs tubes de PCR.
- 8.1.4.1. Pipeter plusieurs fois, puis fermer le tube ou sceller la plaque avec des barrettes de bouchon ou un film d'étanchéité ; OU
- 8.1.4.2. Fermer le tube ou sceller la plaque avec des barrettes de bouchon ou un film d'étanchéité, puis mélanger au vortex à vitesse maximale pendant environ 15 secondes.
- 8.1.4.3. En cas d'utilisation d'un tube PCR, centrifuger le ou les tubes pendant 2 à 5 secondes à l'aide d'une microcentrifugeuse. En cas d'utilisation d'une plaque PCR, centrifuger la plaque à 1 000 FCR pendant environ 30 secondes.

8.2. Amplification PCR

- 8.2.1. Amplifier le ou les tubes ou la plaque selon les paramètres PCR fournis dans le Tableau 6.
- 8.2.1.1. S'assurer que le réglage du *Reaction Volume* (Volume de réaction) est de **50 µl** et que la *Cover Temperature* (Température de couverture) est réglée sur **105 °C**.
- 8.2.1.2. S'assurer que le réglage du *Reaction Volume* est de **50 µl** et que la *Cover Temperature* est réglée sur **105 °C**.
- 8.2.2. Une fois le programme de PCR terminé, retirer la plaque ou les tubes d'amplification du thermocycleur.
- 8.2.2.1. Les produits de PCR peuvent être conservés entre 2 °C et 8 °C jusqu'à 7 jours ou entre -30 °C et -15 °C jusqu'à 3 mois avant la détection.
- 8.2.2.2. Suivre la section *Créer un plan de plaque* du mode d'emploi du logiciel pour créer un plan de plaque avant de passer à la section 8.3.

Tableau 6. Paramètres de PCR

Étape	Température	Durée	Cycles	Vitesse de montée en température
1	95 °C	7 minutes	1	75 %
2	95 °C	45 secondes	35	
3	60 °C	45 secondes		
4	72 °C	90 secondes		
5	72 °C	10 minutes	1	
6	15° C	∞	Maintenir	

8.3. Préparation de la plaque de détection

Remarque : S'assurer que le plan de plaque a été créé conformément à la section *Créer un plan de plaque* du mode d'emploi du logiciel.

- 8.3.1. Laisser un nombre approprié de tubes de Hi-Di formamide décongeler à température ambiante.
- La taille unitaire du Hi-Di formamide, 3500 Dx Series est de 5 ml.
- Remarque :** Pour éviter les cycles de congélation/décongélation, le Hi-Di formamide peut être décongelé, mélangé et aliquoté dans des tubes de 2 ml à un volume de 1 ml et conservé conformément aux instructions du fabricant.
- 8.3.2. Sortir un tube de marqueur de taille LIZ v2.0 Dx du réfrigérateur.
- 8.3.3. Mélanger au vortex le Hi-Di formamide et le standard de taille LIZ à la vitesse maximale pendant 5 à 15 secondes.
- 8.3.4. Centrifuger les tubes pendant environ 2 à 5 secondes.
- 8.3.5. Dans un nouveau tube au volume approprié, combiner la quantité requise de Hi-Di Formamide avec les étalons de taille LIZ.
- 8.3.5.1. Le rapport final doit être de **0,056** (56 µl d'étalon de taille LIZ + 1 000 µl de Hi-Di Formamide).
- S'assurer que le volume de solution LIZ:Hi-Di est suffisant pour aliquoter 19 µl par réaction.
- 8.3.5.2. Mélanger la solution au vortex à la vitesse maximale pendant 5 à 15 secondes, puis centrifuger pendant 2 à 5 secondes.
- 8.3.6. Centrifuger la plaque ou les tubes d'amplification de la section 8.2.2 à 1 000 FCR pendant 30 secondes.
- 8.3.7. Dans une nouvelle plaque PCR à 96 puits, combiner 19 µl de solution LIZ:Hi-Di avec 1 µl de produit PCR par puits.
- Vérifier qu'un seul type de matrice de réaction (c.-à-d., échantillon, contrôle positif, contrôle négatif, contrôle sans matrice) est présent par puits.
- 8.3.8. Ajouter 20 µl de Hi-Di Formamide dans les puits vides de l'injection de 24 puits.
- Chaque injection sur les analyseurs génétiques ABI 3500xL Dx ou ABI 3500xL Genetic Analyzer évalue 24 puits à la fois.

- 8.3.9. Mélanger la plaque de détection en :
- 8.3.9.1. Pipetant plusieurs fois de haut en bas, puis en scellant la plaque avec des barrettes de bouchon ou une feuille d'étanchéité ; **OU**
 - 8.3.9.2. Scellant la plaque avec des barrettes de bouchon ou un film d'étanchéité, puis en mélangeant au vortex à vitesse maximale pendant 15 secondes.
 - 8.3.9.3. Centrifugeant la plaque à 1 000 FCR pendant 30 secondes.
 - 8.3.9.4. Dénaturant la plaque de détection selon les paramètres du Tableau 7 sur le thermocycleur.

Remarque : Consulter la section 8.3.1 pour confirmer que les volumes de réactif ABI sont suffisants pour la série.

Tableau 7. Paramètres de dénaturation

Étape	Température	Durée	Cycles	Vitesse de montée en température
1	95 °C	3 minutes	1	75 %
2	4° C	5 minutes	1	

- 8.3.9.5. S'assurer que le réglage du *Reaction Volume* est de **20 µl** et que la *Cover Temperature* est réglée sur **105 °C**.
- 8.3.10. Démarrer la série.
 - 8.3.10.1. Une fois le programme de dénaturation terminé, retirer la plaque de détection du thermocycleur et centrifuger la plaque à 1 000 FCR pendant 30 secondes.

8.4. Installer les paramètres du test

Les paramètres du test peuvent être importés à partir du fichier *IGH-IP.xml* fourni, inclus dans le progiciel IdentiClone Dx IGH Software (REF 91010111) et nécessite la *bibliothèque IVD ABI 3500 Dx Series Data Collection Software 3*.

Remarque : La section 8.4 est requise pour la première utilisation de ce test avec n'importe quel instrument ABI.

Remarque : Confirmer que les paramètres du test sont correctement définis avant de passer à la section 8.5.

IMPORTANT ! Les paramètres Instrument Protocol (Protocole de l'instrument) et Sizecalling Protocol (Protocole d'identification de la taille) détermineront comment les échantillons seront traités (c.-à-d., analyse des fragments). Il est essentiel de s'assurer que les paramètres corrects sont enregistrés avec le bon nom de test (*paramètres de l'instrument IGH*) pour une exécution correcte du test.

- 8.4.1. Importer les paramètres de l'instrument IdentiClone Dx IGH Assay dans l'instrument ABI.
 - 8.4.1.1. Double-cliquer sur l'icône **ABI 3500 Dx** pour ouvrir le 3500 Dx Series Data Collection Software 3 IVD.
 - 8.4.1.1.1. Dans le menu du tableau de bord, cliquer sur **Library (Bibliothèque)** .
 - 8.4.1.1.2. Cliquer sur **Manage (Gérer)** , puis sélectionner **Tests** dans le menu déroulant.
 - 8.4.1.1.2.1. Sélectionner l'icône **Import (Importer)** , puis naviguer jusqu'au chemin de fichier du progiciel et sélectionner *IGH-IP.xml*.
- 8.4.2. Importer la convention de nom de fichier du test IdentiClone Dx IGH Assay dans l'instrument ABI.
 - 8.4.2.1.1. Cliquer sur **Manage** , puis sélectionner **File Name Convention (Convention de nom de fichier)** dans le menu déroulant.
 - 8.4.2.1.1.1. Sélectionner l'icône **Import (Importer)** , puis accéder au chemin de fichier du progiciel et sélectionner *IGH-FNC.xml*.
- 8.4.3. Importer le groupe de résultats du test IdentiClone Dx IGH Assay dans l'instrument ABI.
 - 8.4.3.1.1. Cliquer sur **Manage** , puis sélectionner **Results Group (Groupe de résultats)** dans le menu déroulant.
 - 8.4.3.1.1.1. Sélectionner l'icône **Import** , puis accéder au chemin de fichier du progiciel et sélectionner *IGH-RG.xml*.

- 8.4.4. Vérifier que les paramètres appropriés de l'*Instrument Protocol* (Figure 3) et du *Sizcalling Protocol* (Figure 4) sont correctement configurés et enregistrés dans la bibliothèque de tests sur l'ABI 3500 Data Collection Software.

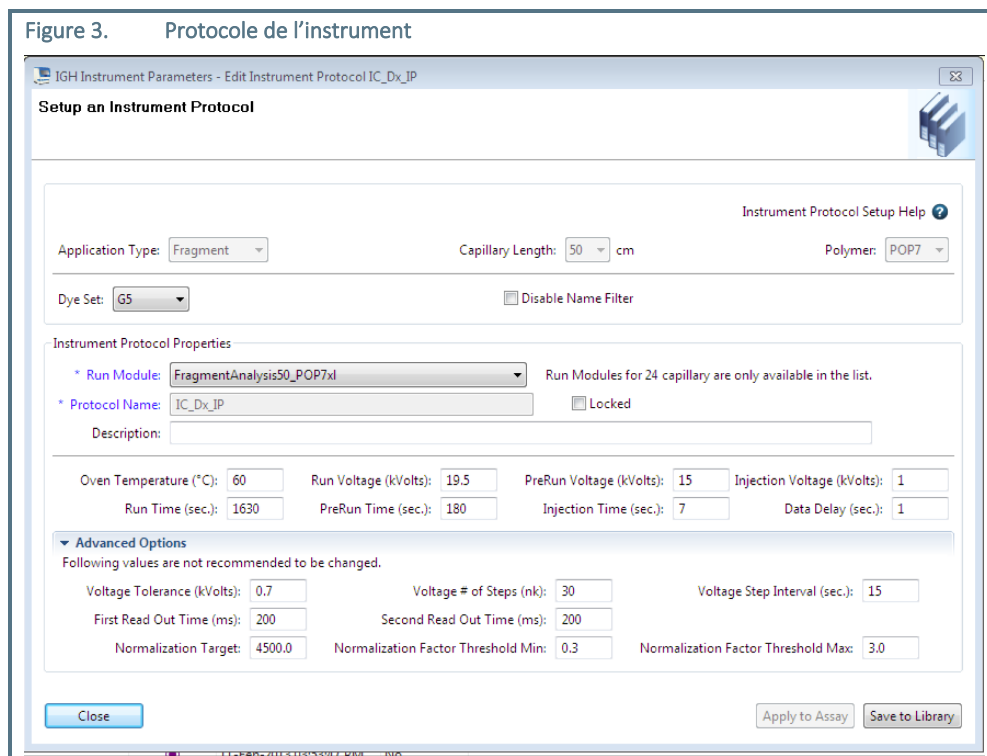
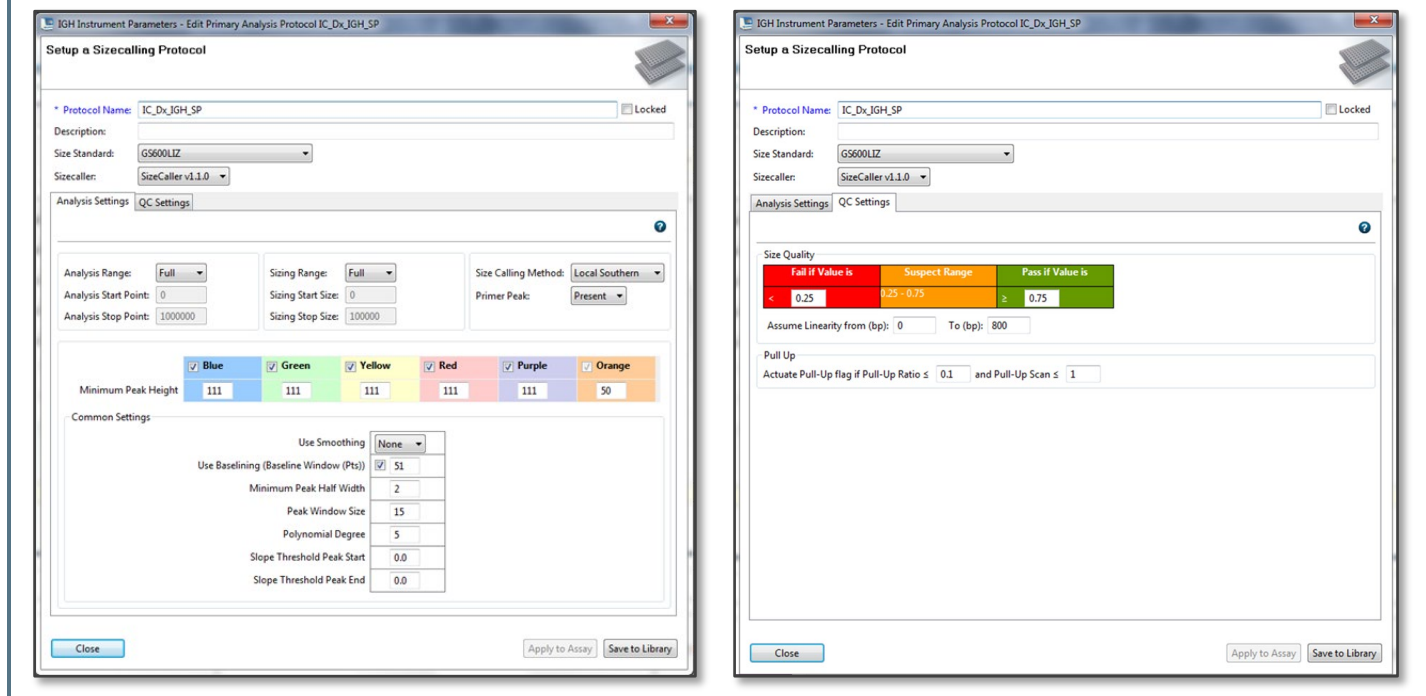
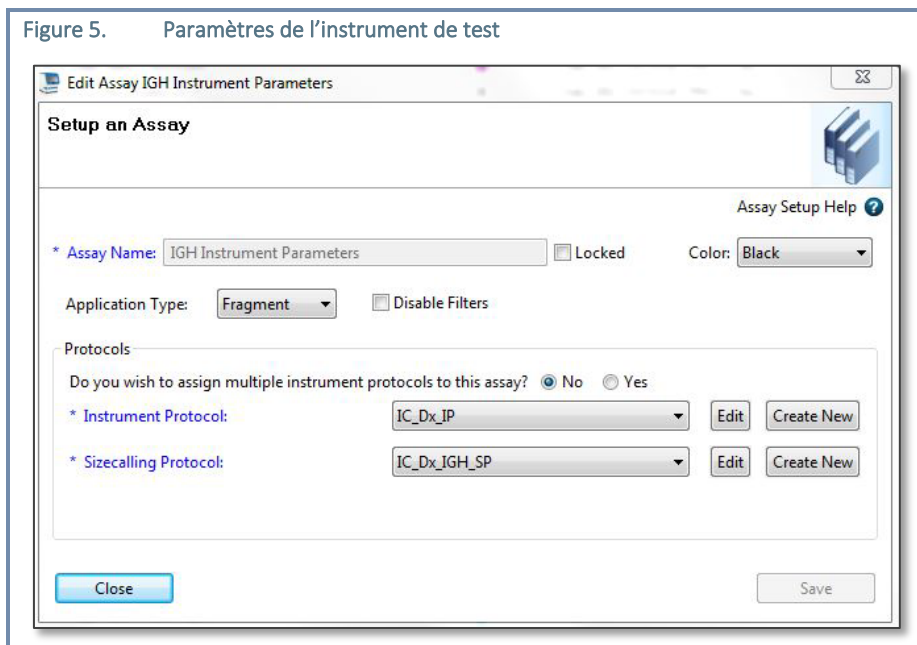


Figure 4. Onglets Sizcalling Protocol

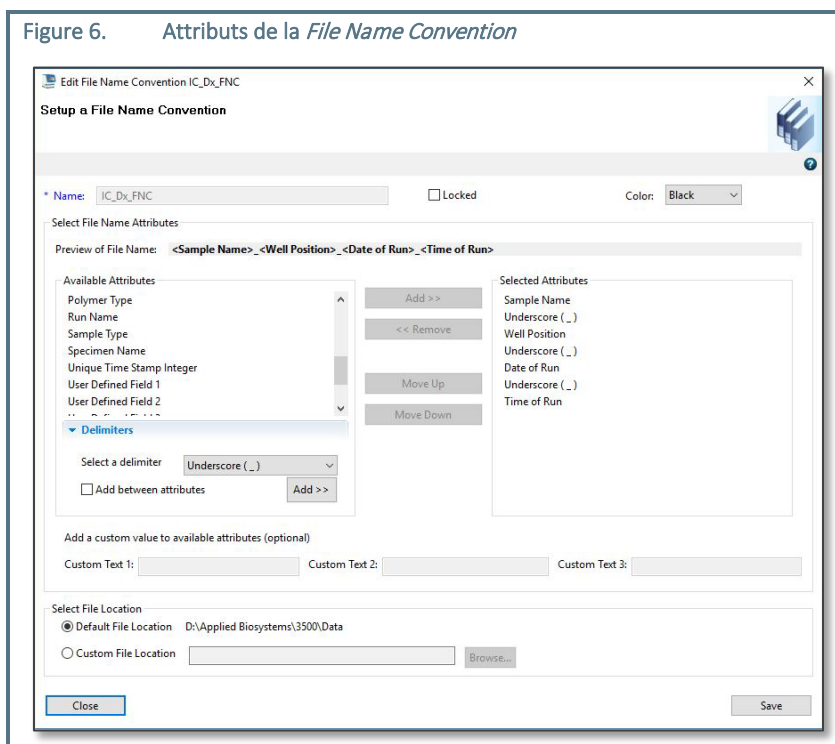



- 8.4.4.1. Enregistrer les paramètres du test dans la bibliothèque de tests ABI 3500 Dx en utilisant le nom *IC_Dx_IP* pour le protocole de l'instrument et *IC_Dx_IGH_SP* pour le protocole d'identification de la taille, **exactement** comme indiqué sur la Figure 5.



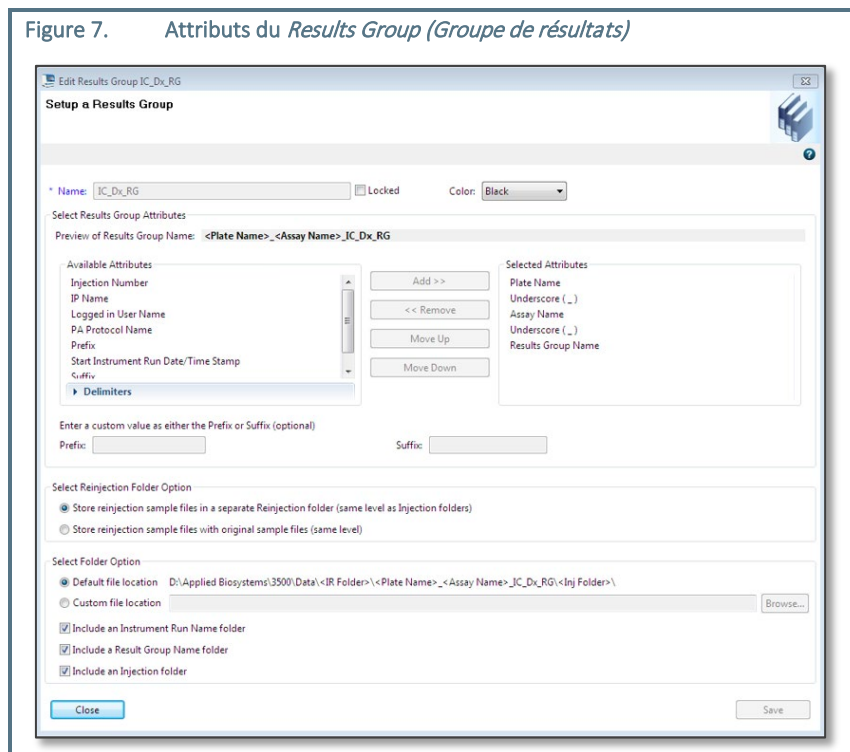
- 8.4.4.2. Dans la section *File Name Convention (Convention de nom de fichier)*, cliquer sur l'icône du crayon pour s'assurer que les paramètres de la convention de nommage (FNC) correspondent à ceux de la Figure 6 et sont enregistrés sous *IC_Dx_FNC* (comme illustré).
- 8.4.4.2.1. La FNC détermine les champs de données et l'ordre dans lequel les fichiers de données résultants (fichiers FSA) seront contenus.
- 8.4.4.2.2. Vérifier que les attributs sélectionnés correspondent à l'ordre indiqué sur la Figure 6.

IMPORTANT : Confirmer que le champ *Sample Name (Nom de l'échantillon)* figure en premier dans la liste des *Selected Attributes (attributs sélectionnés)*.



- 8.4.5. Dans la section *Results Group (Groupe de résultats)*, cliquer sur l'icône du **crayon**  pour s'assurer que les paramètres du *Results Group (RG)* correspondent à ceux de la Figure 7 et sont enregistrés sous **IC_Dx_RG** (comme illustré).
- 8.4.5.1. Le groupe de résultats est utilisé pour nommer, trier et personnaliser les dossiers dans lesquels les fichiers de données d'échantillons sont stockés.
- 8.4.5.2. Vérifier que les attributs sélectionnés correspondent à l'ordre indiqué sur la Figure 7.

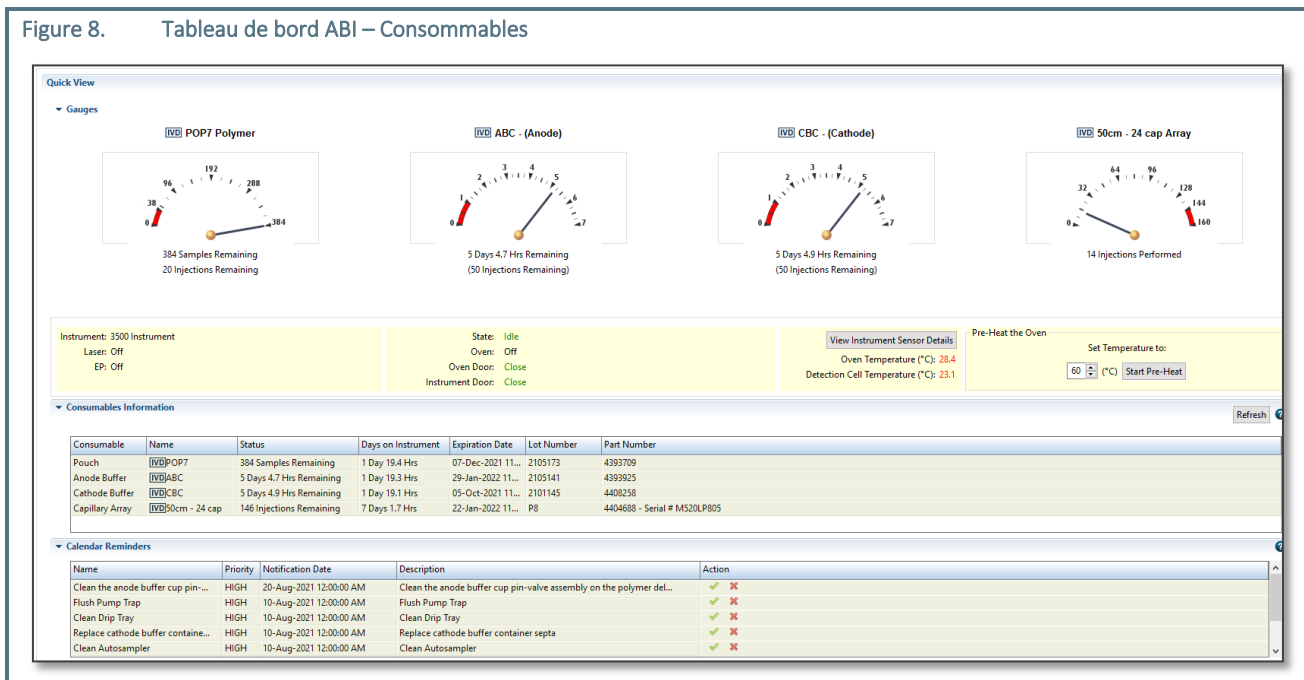
IMPORTANT : Configurer correctement la convention de nommage et le groupe de résultats comme indiqué ci-dessus pour éviter toute erreur d'analyse des données.



8.5. Analyse des fragments par électrophorèse capillaire

- 8.5.1. Vérifier l'état des consommables de l'instrument.
- 8.5.1.1. Dans le tableau de bord de l'instrument ABI, cliquer sur **Refresh (Actualiser)**, puis contrôler le temps restant de l'instrument et le nombre d'injections effectuées pour les consommables (Figure 8), et vérifier les éléments suivants :
- 8.5.1.1.1. Volumes de réactif ABI suffisants pour la ou les séries d'électrophorèse capillaire (EC) ;
- 8.5.1.1.2. Les tampons, le polymère et le capillaire n'ont pas dépassé la durée maximale autorisée sur l'instrument ;
- 8.5.1.1.3. Le nombre d'injections restantes pour chaque composant est suffisant pour le nombre d'injections requises pour la ou les séries d'EC ; et
- 8.5.1.1.4. Le POP7 restant est suffisant pour le nombre d'échantillons dans la ou les séries.
- 8.5.1.2. Si un consommable est périmé ou doit être remplacé, suivre les instructions du fabricant pour effectuer la maintenance nécessaire avant de continuer.

Figure 8. Tableau de bord ABI – Consommables



8.5.1. Importer le plan de plaque ABI (CSV) terminé et créé avec le logiciel IdentiClone Dx IGH Software (consulter la section *Créer un plan de plaque* dans le mode d'emploi du logiciel).

IMPORTANT ! **S'assurer qu'un fichier LIVS a été créé lorsque le plan de plaque a été généré. Si le fichier LIVS est manquant, le logiciel IdentiClone Dx IGH Software ne pourra PAS effectuer l'analyse des résultats.**

- 8.5.1.1. Cliquer sur **Create New Plate (Créer une nouvelle plaque)** et saisir un nom pour la plaque.
- 8.5.1.2. Sélectionner **96** comme *Number of Wells (Nombre de puits)*.
- 8.5.1.3. Sélectionner **Fragment** comme *Plate Type (Type de plaque)*.
- 8.5.1.4. Sélectionner **50 cm** comme *Capillary Length (Longueur capillaire)*.
- 8.5.1.5. Sélectionner **POP7** comme *Polymer Type (Type de polymère)*.
- 8.5.1.6. Cliquer sur **Assign Plate Contents** (Attribuer le contenu de la plaque).
- 8.5.1.7. Cliquer sur **Import (Importer)**.

8.5.2. Vérifier que les attributs corrects du plan de plaque ont été importés.

8.5.2.1. Ouvrir le plan de plaque ABI (CSV) créé avec le logiciel IdentiClone Dx IGH Software.

8.5.2.1.1. Vérifier que tous les puits d'échantillon et de contrôle sont correctement nommés et que chaque puits se voit attribuer l'*Assay (Test)*, la *File Name Convention* et le *Results Group* corrects (voir les sections 8.4.5 et 8.4.3, respectivement).

8.5.2.2. Si le plan de plaque ne correspond pas à la configuration prévue, créer un nouveau fichier de plan de plaque ABI à partir de la section 8.5.1.

IMPORTANT ! **NE PAS modifier le plan de plaque à l'aide de l'analyseur génétique ABI. Utiliser le logiciel pour modifier le plan de plaque afin de s'assurer que le fichier LIVS associé est également mis à jour.**

Si le plan de plaque et les fichiers LIVS sont mal alignés, le logiciel ne pourra PAS effectuer l'analyse des résultats.

8.5.2.3. Sélectionner tous les puits qui ne contiennent pas de réaction (échantillon ou contrôle), *cliquer avec le bouton droit* de la souris et sélectionner **Delete (Supprimer)** pour empêcher la génération des résultats.

Remarque : Si cette étape n'est pas effectuée, cela peut entraîner des erreurs de QT et/ou endommager le capillaire.

8.5.2.4. Cliquer sur **Save Plate (Enregistrer la plaque)**, puis cliquer sur **Link Plate for Run (Associer la plaque pour la série)**.

- 8.5.3. Exécuter la plaque sur l'analyseur génétique ABI 3500xL Dx ou ABI 3500xL Genetic Analyzer.
- 8.5.3.1. Charger la plaque de détection appropriée (préparée dans la section 8.3) sur l'instrument ABI conformément aux instructions du fabricant.
- 8.5.3.1.1. Vérifier que tous les puits occupés dans la plaque de détection sont exempts de bulles d'air et que le contenu se trouve au fond du puits.
- 8.5.3.1.2. Vérifier que l'orientation de la plaque est correcte lorsqu'elle est placée dans l'instrument.
- 8.5.3.1.3. Vérifier que la position de la plaque sur l'instrument ABI est correctement sélectionnée (plaque A contre plaque B).
- 8.5.3.2. Cliquer sur **Start Run (Démarrer la série)**.
- L'instrument effectue l'initialisation et si tous les contrôles de qualité internes donnent un état Succès, la série commence.
- 8.5.3.2.1. S'assurer que la série a commencé ; vérifier que le fond du jeu d'échantillons dans la première injection sur l'écran de la plaque devient vert.
- 8.5.4. Préparer les données de la série pour l'analyse
- 8.5.4.1. Après la série ABI, vérifier que la série est terminée sans erreurs, puis naviguer jusqu'à l'emplacement du fichier contenant les résultats de la série au format FSA.
- L'emplacement du fichier FSA est déterminé par le *Results Group*, enregistré dans la section 8.4.1, Figure 5.
- 8.5.4.1.1. Copier les fichiers FSA au même endroit contenant les fichiers LIMS générés par le logiciel.
- L'emplacement du fichier LIMS est spécifié pendant la *Plate Setup (Configuration de la plaque)* (consulter le mode d'emploi du logiciel) au moment de l'enregistrement du plan de plaque.
- 8.5.4.1.2. Procéder à l'analyse des données à l'aide du logiciel IdentiClone Dx IGH Software, voir la section *Analyse des résultats* dans le mode d'emploi du logiciel correspondant.
- 8.5.4.2. Retirer la plaque de la base de l'instrument ABI et la jeter.

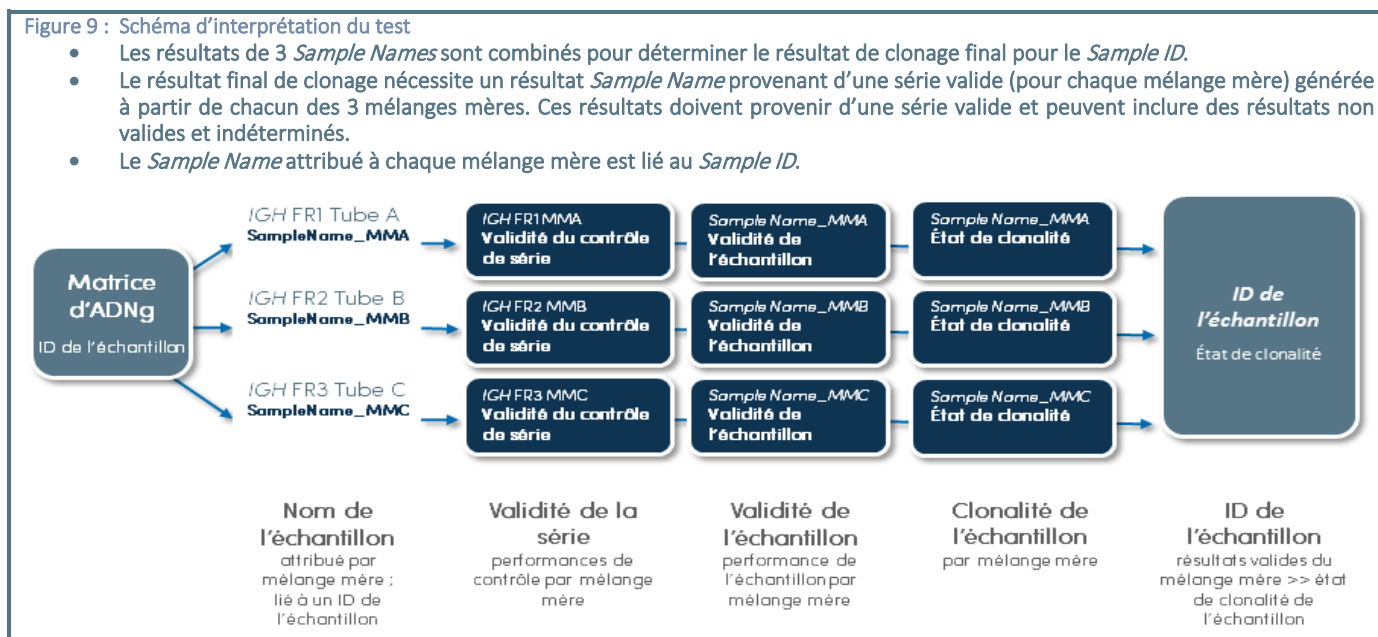
8.6. Contrôle qualité

Des contrôles positifs, négatifs et sans matrice sont fournis avec le kit et doivent être inclus chaque fois que le test est réalisé. Les données générées par le test seront interprétées par le logiciel IdentiClone Dx IGH Software, comme décrit dans la section 9.

9. Interprétation des résultats

9.1. Points de contrôle du logiciel

Le logiciel IdentiClone Dx IGH Software interprète les données générées par l'instrument ABI en suivant une logique prédéterminée qui nécessite des points de contrôle de validité pour poursuivre avec l'étape d'analyse suivante (voir Figure 9). L'état de la clonalité de l'échantillon (c.-à-d., résultat *Sample ID*) nécessite au moins un résultat d'une série valide pour chaque mélange mère (c.-à-d., résultats du *Sample Name*).



9.1.1. Les contrôles de série sont évalués pour déterminer la validité de la série.

9.1.1.1. Un état de série valide nécessite que les 3 types de contrôles de série (positif, négatif et aucun modèle) génèrent des résultats valides ; sinon, l'état de la série n'est pas valide.

9.1.1.2. Tous les résultats du *Sample Name* inclus dans une série non valide seront automatiquement considérés comme non valides et l'analyse ne se poursuivra pas.

IMPORTANT ! Seules les séries valides, qui nécessitent que les 3 contrôles soient valides, passeront à l'étape suivante.

9.1.2. La validité des résultats du *Sample Name* d'une série valide est évaluée (par mélange mère individuel).

9.1.2.1. Un résultat *Sample Name* non valide ne fera pas l'objet d'une analyse supplémentaire (c'est-à-dire, l'état de clonalité du mélange mère).

9.1.3. Les résultats du *Sample Name* valides sont évalués en termes de clonalité (par mélange mère individuel).

9.1.3.1. Clonal

9.1.3.2. Non clonal

9.1.3.3. Indéterminé

9.1.4. Des résultats valides du *Sample Name* pour les 3 mélanges mères sont évalués pour déterminer l'état de clonalité de l'échantillon (résultat du *Sample ID* [ID de l'échantillon]), voir la Figure 10.

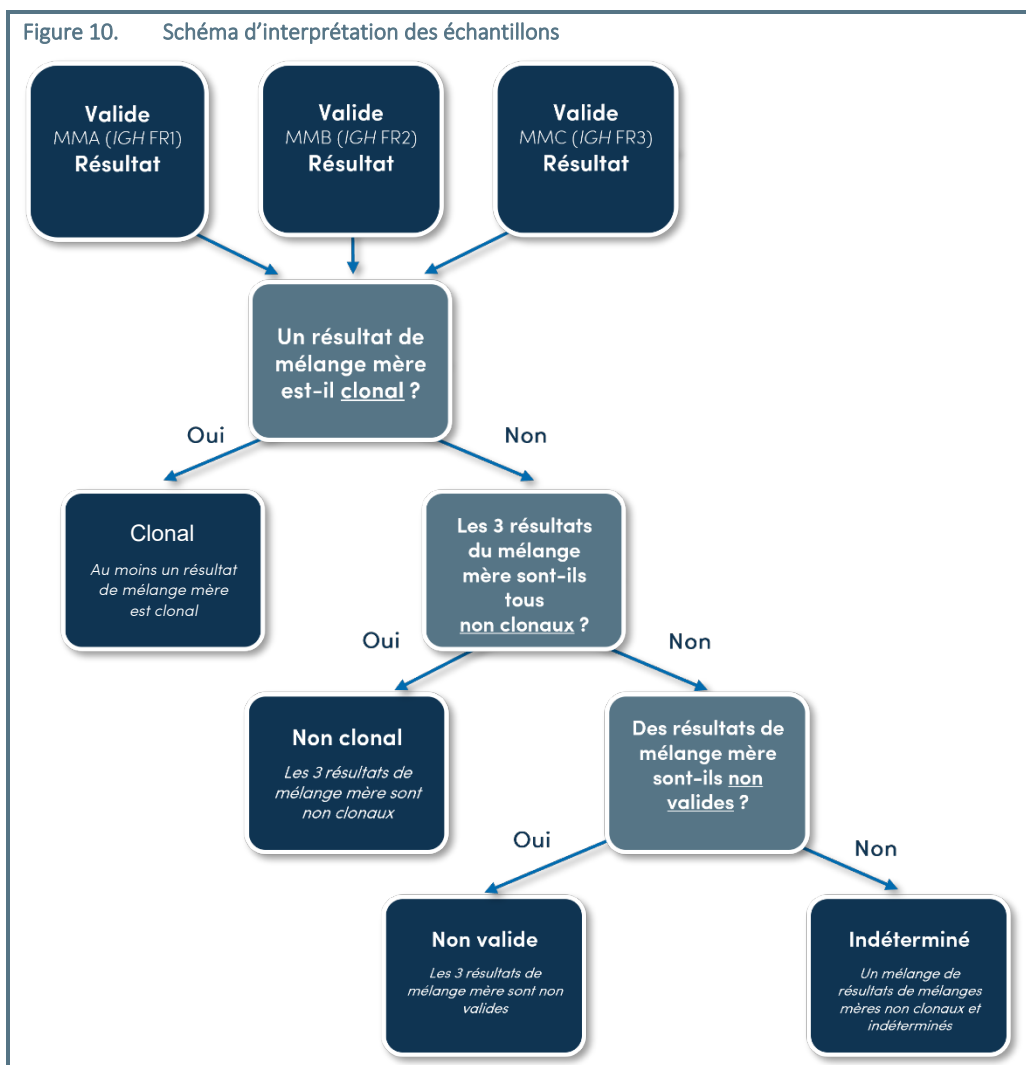
9.1.4.1. Si un ou plusieurs résultats du *Sample Name* (ou mélange mère-échantillon) sont Clonal, le résultat du *Sample ID* est **Clonal**.

9.1.4.2. Si tous les résultats du *Sample Name* (ou mélange mère-échantillon) sont Non-Clonal, le résultat du *Sample ID* est **Non-Clonal**.

9.1.4.3. Si les résultats du *Sample Name* (ou mélange mère-échantillon) sont un mélange de résultats Indeterminate (Indéterminé) et Non-clonal (Non clonal), le résultat du *Sample ID* est **Indeterminate (Indéterminé)**.

9.1.4.4. Si un résultat du *Sample Name* (ou mélange mère-échantillon) est non valide et que d'autres résultats sont Non-Clonal ou Indeterminate, le résultat du *Sample ID* est **Invalid (Non valide)**.

9.1.4.4.1. Des résultats non valides pour le *Sample Name* (ou mélange mère-échantillon) d'une série valide peuvent être retestés conformément à la section 10 pour résoudre l'état de clonalité du *Sample ID*.



10. Retester, le cas échéant

10.1. Analyses non valides

- 10.1.1. Une série dans laquelle l'un des contrôles ne répond pas aux critères de validité est une **Invalid Run (Série non valide)**. Répéter la série avec tous les échantillons, le contrôle positif, le contrôle négatif et le NTC. Chaque mélange mère est analysé indépendamment.
- 10.1.2. Répéter la série conformément au mode d'emploi du logiciel associé, en fonction du ou des codes d'erreur répertoriés dans le rapport de série du logiciel IdentiClone Dx IGH Software.

10.2. Échantillons non valides au sein de séries valides

Les résultats de *Sample Name* non valides générés à partir d'une série valide nécessitent un nouveau test si les résultats de *Sample Name* des autres mélanges mères incluent Non-clonal (Non clonal) et/ou Indeterminate ; sinon, un nouveau test n'est pas nécessaire. Voir la Figure 11 pour la hiérarchie de répétition du test.

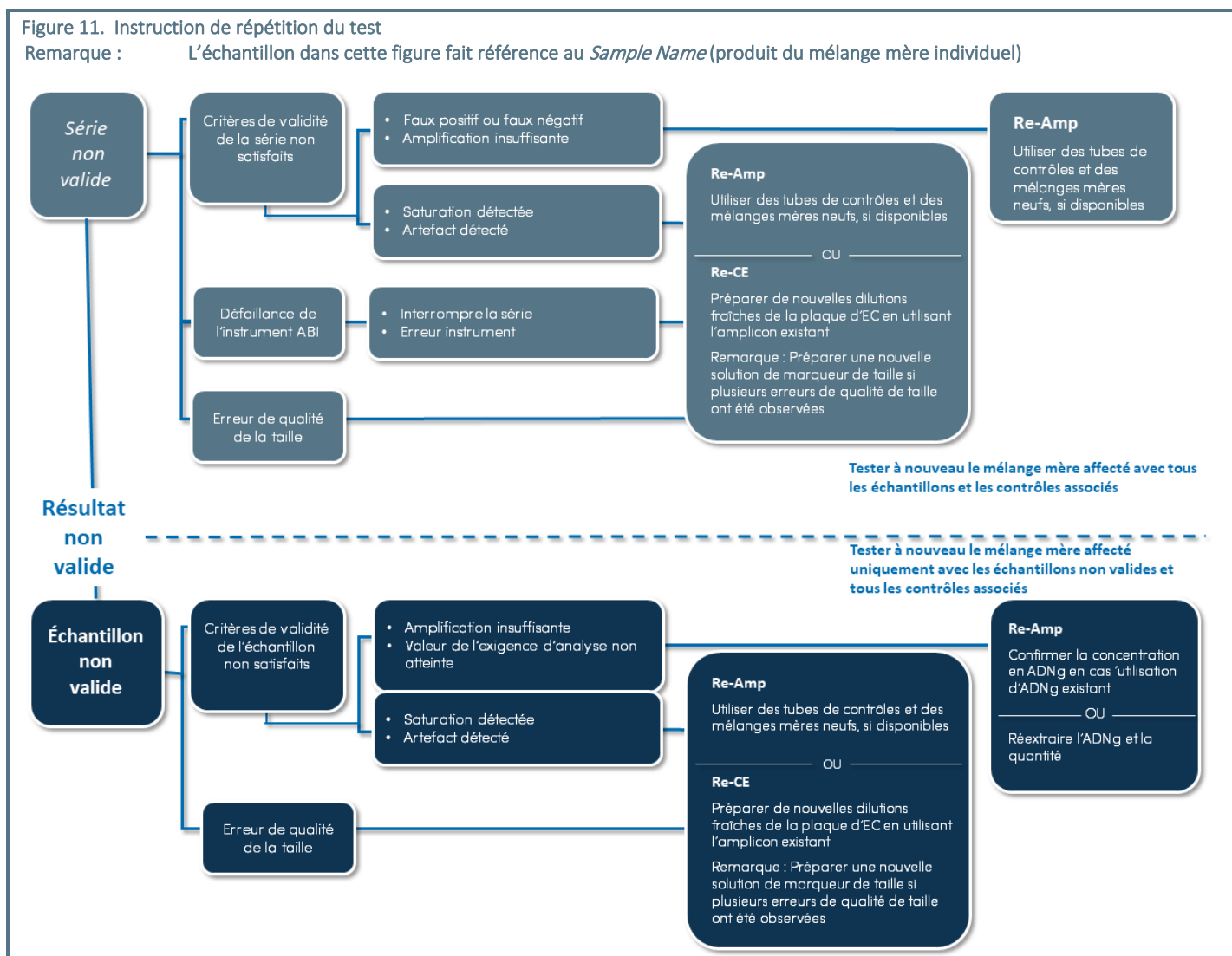
- 10.2.1. Si les résultats de l'un des mélanges mères sont **Clonal** (dans une série valide), aucun nouveau test n'est nécessaire.
- 10.2.2. Si les résultats de tous les mélanges mères sont **Non-Clonal** (dans des séries valides), aucun nouveau test n'est nécessaire.
- 10.2.3. Si les résultats de tous les mélanges mères sont **Non-Clonal, Indeterminate** et **Invalid**, tester à nouveau le ou les *Sample Names* avec le résultat Invalid et les contrôles de série associés conformément au code d'erreur (voir Figure 11).

10.3. Détails d'échec et répétition des tests

Jusqu'à quatre événements de répétition du test sont autorisés lorsque les échecs sont dus à une cause différente (c.-à-d., 1^{er} tour ⇒ résultat de *Sample Name Invalid* en raison d'une série Invalid ; 2^e tour ⇒ résultat *Sample Name Invalid* en raison d'artefacts ; 3^e tour ⇒ résultat *Sample Name Invalid* en raison d'une saturation ; 4^e tour ⇒ résultat *Sample Name Invalid* en raison d'une erreur QT).

Figure 11. Instruction de répétition du test

Remarque : L'échantillon dans cette figure fait référence au *Sample Name* (produit du mélange mère individuel)



11. Limites de la procédure

- Limite de détection : Clonalité des lymphocytes B de 2,5 %
- Ce test n'identifie pas 100 % des populations cellulaires clonales.
- Toujours interpréter les résultats des tests de clonalité moléculaire dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.
- Les analyses PCR sont sujettes à des interférences dues à la dégradation de l'ADN ou à l'inhibition de la PCR par l'EDTA, l'héparine ou d'autres agents.

12. Caractéristiques de performance

12.1. Validations des échantillons – Stabilité des échantillons

12.1.1. Cette étude fournit une évaluation de la validité du type d'échantillon pour étayer les revendications proposées dans le mode d'emploi ; le dispositif expérimental est validé pour le sang périphérique anticoagulé avec de l'EDTA. L'objectif de cette étude est de déterminer la stabilité du sang périphérique anticoagulé avec le type d'échantillon EDTA pour le test IdentiClone Dx *IGH* Assay en fournissant des preuves objectives à partir des échantillons testés avant et après diverses conditions de conservation avec le dispositif expérimental par rapport aux résultats des tests de référence spécifiques aux échantillons. Cette étude a été menée sur 2 réplicats de 15 échantillons (10 lymphocytes B clonaux/positifs, 5 non clonaux/négatifs) testés à 5 points temporels différents avec 1 lot de réactifs, sur plusieurs instruments ABI 3500xL Dx, par plusieurs opérateurs sur plusieurs jours. Les points temporels testés comprennent :

- Point temporel-0 : Référence
- Point temporel-1 : Réfrigéré (2 à 8 °C) pendant 5 jours
- Point temporel-2 : Réfrigéré (2 à 8 °C) pendant 7 jours
- Point temporel-3 : Température ambiante (15-30 °C) pendant 5 jours
- Point temporel-4 : Température ambiante (15-30 °C) pendant 7 jours

12.1.2. Le Tableau 8 fournit le résultat du test pour chaque réplicat testé sur les 15 échantillons. Tous les résultats des tests d'échantillons (2 réplicats pour chacun des 15 échantillons) étaient valides (taux de validité de l'échantillon de 100,0 %, 30/30). Les deux réplicats de chaque échantillon non clonal et clonal ont généré les résultats attendus, indiquant une concordance de 100,0 % entre le Point temporel-0 et le Point temporel-1, le Point temporel-0 par rapport au Point temporel-2, le Point temporel-0 par rapport au Point temporel-3 et le Point temporel-0 par rapport au Point temporel-4.

Tableau 8. Résumé des résultats de l'état de clonalité

ID du patient	Réplicat	État de clonalité				
		Point temporel 0	Point temporel 1	Point temporel 2	Point temporel 3	Point temporel 4
CS189	1	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal
	2	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal
030723-1	1	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal
	2	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal
030723-2	1	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal
	2	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal
041223-4	1	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal
	2	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal
CS231	1	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal
	2	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal	Non clonal
CS201	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS08	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS09	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS10	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS11	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS12	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS13	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal

Tableau 8. Résumé des résultats de l'état de clonalité

ID du patient	Réplicat	État de clonalité				
		Point temporel 0	Point temporel 1	Point temporel 2	Point temporel 3	Point temporel 4
DLS14	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS15	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS16	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal

- 12.1.2.1. Les résultats de cette étude ont établi que la stabilité du sang périphérique anticoagulé avec un type d'échantillon EDTA à utiliser avec le test IdentiClone Dx *IGH* Assay était ≥ 5 jours lorsqu'il est conservé entre 2 °C et 8 °C ou à température ambiante (entre 15 °C et 30 °C).

12.2. Seuil clinique

- 12.2.1. Cette étude effectue une évaluation comparative des données historiques générées par le test IdentiClone Dx *IGH* Assay avec des échantillons cliniques, précédemment identifiés comme positifs pour les réarrangements clonaux du gène *IGH*, afin d'établir la valeur de seuil clinique du rapport de pic relatif (RPR). Les deux méthodes de référence sélectionnées comprennent 1) un test de DIV disponible dans le commerce (au moment de l'étude) qui applique le séquençage de nouvelle génération (NGS) pour détecter les réarrangements clonaux du gène *IGH* (test de référence), avec une utilisation prévue similaire au dispositif expérimental, au test IdentiClone Dx *IGH* Assay, et 2) le diagnostic clinique basé sur les codes ICD-10 pour la maladie lymphoproliférative des cellules B (clonale attribuée) ou saine (non clonale attribuée).
- 12.2.2. Dans l'ensemble, les résultats de 170 échantillons ont été évalués. Le premier ensemble de données comprenait 114 échantillons qui ont généré un résultat valide avec le test de référence (IVD) et le test IdentiClone Dx *IGH* Assay (IUO) ; ceux-ci ont été évalués pour déterminer le pourcentage (%) de concordance des résultats générés par les deux tests. L'évaluation a été réalisée en utilisant 3 valeurs RPR différentes comme seuil : 2,0, 3,0 et 4,0. Le deuxième ensemble de données comprenait 145 échantillons qui ont généré un résultat valide avec le test IdentiClone Dx *IGH* Assay en conjonction avec un diagnostic clinique connu basé sur le code ICD-10 ou sur l'état de santé. Cet ensemble de données a été évalué pour le pourcentage de concordance entre les 2 classifications (clonal ou non clonal) en utilisant une valeur seuil de 3,0. Différents sous-ensembles de résultats de test des 170 échantillons ont été utilisés pour l'évaluation parce que certains échantillons ont généré des résultats non valides avec l'IdentiClone Dx *IGH* Assay (IUO) ou le test de référence (DIV), ou parce que les informations de diagnostic clinique (code ICD-10 ou état de santé) n'étaient pas disponibles.
- 12.2.2.1. Le premier ensemble de données de 114 échantillons a comparé les résultats de clonage générés par le test IdentiClone Dx *IGH* Assay au test de référence en utilisant la valeur RPR définie à $\geq 3,0$ comme seuil. Le PCG, le PCP et le PCN par rapport au test de référence étaient respectivement de 92,1 %, 93,8 % et 87,9 %. La limite inférieure de l'IC à 95 % calculée à l'aide de la méthode du score bilatéral pour le PCP et le PCN était de 86,4 % et 72,7 %, respectivement. (Tableau 9) Pour garantir la robustesse d'une valeur RPR seuil clinique de 3,0, les mêmes données ont été réanalysées en utilisant des valeurs RPR inférieures et supérieures à un RPR = 3,0 (c.-à-d., RPR = 2,0 et RPR = 4,0). La valeur RPR de seuil clinique définie à $\geq 3,0$ s'est avérée optimale, car elle a généré la meilleure valeur de pourcentage de concordance entre le dispositif expérimental et le test de référence, avec un écart plus large par rapport à la valeur RPR immédiatement inférieure.

Tableau 9. Évaluation par rapport au test de référence (IVD)

IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay (IUO)	Test de référence (IVD)		Total
	Clonal	Non clonal	
Clonal	76	4	80
Non clonal	5	29	34
Total	81	33	114
PCG	92,1 %		
PCP	93,8 % (IC à 95 % : 86,4 %–97,3 %)		
PCN	87,9 % (IC à 95 % : 72,7 %–95,2 %)		

- 12.2.2.2. Le deuxième ensemble de données comprenait 145 échantillons et a comparé un diagnostic clinique connu (code ICD-10 ou état de santé) aux résultats de clonalité générés avec le test IdentiClone Dx *IGH* Assay en utilisant une valeur RPR $\geq 3,0$ comme seuil. Le PCG, le PCP et le PCN résultants par rapport au diagnostic clinique étaient respectivement de 91,7 %, 92,8 % et 90,3 %. Les LI de l'IC à 95 % calculées à l'aide de la méthode du score bilatéral pour le PCP et le PCN étaient de 85,1 % et 80,5 %, respectivement. (Tableau 10)

Tableau 10. Évaluation avec le diagnostic clinique comme méthode de référence

IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay (IUO)	Diagnostic clinique (référence)		Total
	Maladie lymphoproliférative à cellules B	En bonne santé	
Clonal	77	6	83
Non clonal	6	56	62
Total	83	62	145
PCG	91,7 %		
PCP	92,8 % (IC à 95 % : 85,1 %–96,6 %)		
PCN	90,3 % (IC à 95 % : 80,5 %–95,5 %)		

- 12.2.3. Les résultats du test d'échantillon clinique générés par le test IdentiClone Dx *IGH* Assay démontrent une concordance élevée avec les méthodes de référence, en utilisant une valeur RPR de seuil clinique réglée sur $\geq 3,0$, qui est également la valeur RPR de seuil pour déterminer la clonalité. Les LI de l'IC à 95 % pour le PCP et le PCN étaient toutes deux supérieures à 70 % par rapport au test de référence basé sur le NGS, par rapport à un test IVD disponible dans le commerce, ou par rapport au diagnostic clinique.

12.3. Sensibilité analytique : Limite de blanc (LdB)

- 12.3.1. Cette étude établit la limite de blanc (LdB) pour le test IdentiClone Dx *IGH* Assay en testant 20 échantillons provenant de donneurs non clonaux (3 réplicats chacun) avec 2 lots de réactifs sur plusieurs analyseurs génétiques ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer, par plusieurs opérateurs sur plusieurs jours (60 points de données par mélange mère, par lot de réactifs).
- 12.3.2. Tous les échantillons (100 %) du panel de tests LdB testés étaient non clonaux (négatifs) avec un RPR $< 3,0$. Le RPR le plus élevé observé (2,9) a été généré en testant un échantillon clinique négatif avec le MMA, lot de réactifs 2. Pour chaque lot de réactifs, 60 résultats de test ont été classés par le RPR. Le 95^e centile répond au 57,5^e rang ; par conséquent, la moyenne des RPR du 57^e et du 58^e rang pour chaque mélange mère a été calculée pour chaque lot de réactifs. (Tableau 11) En conclusion, en utilisant l'approche conservatrice, la LdB globale du test est déterminée comme un RPR de 2,0.

Tableau 11. Résumé des résultats de LdB

Lot de réactifs	MM	Rang	RPR	RPR moyen des rangs 57 + 58
1	A	57	1,7	1,8
		58	1,8	
	B	57	1,9	2,0
		58	2,0	
	C	57	1,7	1,7
		58	1,7	
2	A	57	1,8	1,9
		58	1,9	
	B	57	1,8	1,9
		58	1,9	
	C	57	1,8	1,9
		58	1,9	

12.4. Sensibilité analytique : Limite de détection (LdD)

- 12.4.1. Cette étude établit une limite de détection (LdD) pour le test IdentiClone Dx *IGH* Assay en fournissant des preuves objectives à partir de résultats générés avec de l'ADNg clinique extrait de sang périphérique représentant les clans *IGH* (I, II et III) dilués avec de l'ADNg à partir d'accumulation de sang périphérique (ASP) provenant de donneurs sains.
- 12.4.2. Au total, 20 échantillons (10 donneurs sains et 10 donneurs suspectés de lymphoproliférations des lymphocytes B avec un état non clonal) comprenaient le ASP utilisé pour préparer les 7 dilutions d'ADNg représentant chaque clan *IGH* (I/II/III) utilisé pour les tests avec le dispositif expérimental : 0,0 %, 0,3 %, 1,0 %, 3,0 % et 10,0 %. Les valeurs RPR résultantes des échantillons générant un résultat Clonal ont été vérifiées par rapport au tableau des normes de clonalité (Tableau 12), qui fournit la corrélation entre la valeur RPR générée pour chaque mélange mère avec chaque clan *IGH* et la dilution en % du réarrangement clonal *IGH*. Au moins 20 résultats valides ont été générés avec le test IdentiClone Dx *IGH* Assay pour chaque clan *IGH* à chaque dilution, avec chaque lot de réactifs. Cette étude a été menée sur 2 lots de réactifs, sur plusieurs instruments ABI3500xL Dx, par plusieurs opérateurs sur plusieurs jours.

Tableau 12. Tableau des normes de clonalité

% de dilution ou % de clonalité	Valeurs RPR du mélange mère								
	<i>IGH</i> clan I ^A			<i>IGH</i> clan II ^B		<i>IGH</i> clan III ^C			
	MMA	MMB	MMC	MMA	MMB	MMA	MMB	MMC	
25 %	65,2	121,9	131,5	91,2	119,5	149,7	169,1	162,8	
10 %	52,6	96,0	92,5	26,5	40,5	53,0	57,3	79,9	
5 %	30,4	48,0	50,4	12,1	18,1	28,7	31,8	34,2	
2,5 %	14,9	25,7	29,9	6,3	8,6	11,8	11,7	15,9	
1,0 %	5,1	10,8	13,3	2,3	3,0	3,9	4,8	7,1	
0,5 %	2,9	4,7	5,9	1,3	1,6	1,8	2,0	3,3	
0,25 %	1,4	2,3	3,1	1,3	1,3	1,4	1,3	1,8	
0,1 %	1,4	1,4	1,4	1,3	1,4	1,3	1,5	1,5	
0,05 %	1,3	1,4	1,3	1,5	1,3	1,2	1,2	1,4	

^ALignée cellulaire IVS-0019 utilisée comme norme clonale pour l'estimation de la clonalité de l'*IGH* clan I

^BLignée cellulaire IVS-0002 utilisée comme norme clonale pour l'estimation de la clonalité de l'*IGH* clan II

^CLignée cellulaire IVS-0003 utilisée comme norme clonale pour l'estimation de la clonalité de l'*IGH* clan III

- 12.4.2.1. La dilution à 1,0 % de l'*IGH* clan I amplifiée avec le mélange mère C (lot de réactifs 1 positif à 95 %, RPR moyen = 4,1) et la dilution de l'*IGH* clan I à 3,0 % avec le MMA, le MMB et le MMC (lot de réactifs 2 MMA positif à 100 %, RPR moyen = 9,9 ; lot de réactifs 2 MMB positif à 100 %, RPR moyen = 12,8 ; lot de réactifs 2 MMC positif à 100 %, RPR moyen = 13,2) sont le % de dilution le plus bas avec un % positif à ≥ 95 % par lot de réactifs du mélange mère. (Tableau 13 et Tableau 14). Étant donné que la LdD doit être établie en fonction des pires performances, le résultat de dilution en % le plus élevé des deux lots de réactifs (valeurs RPR générées par la dilution à 3,0 % de l'*IGH* clan I avec le lot de réactifs 2) a été sélectionné pour évaluation. Les valeurs RPR générées par la dilution du clan I de l'*IGH* à 3,0 % avec chaque mélange mère ont été évaluées par rapport au tableau des étalons clonaux pour convertir la dilution en % en la clonalité en %.
- 12.4.2.1.1. Selon le tableau des normes clonales, les valeurs RPR MMA, MMB et MMC se situent dans la plage correspondant à la plage de clonalité de 1,0 % à 2,5 % pour MMA (plage RPR = 5,1 à 14,9), à la plage de clonalité de 1 % à 2,5 % pour MMB (plage RPR = 10,8 à 26,7) et à la plage de clonalité de 0,5 % à 1 % pour MMC (plage de valeur RPR = 5,9 à 13,3). En utilisant une approche conservatrice, la LdD pour l'*IGH* clan I a été déterminée comme étant une clonalité de 2,5 %.
- 12.4.2.2. La dilution à 3,0 % de l'*IGH* clan II amplifiée avec le MMB est le % de dilution le plus bas où un % positif ≥ 95 % a été observé (lot de réactifs – 100 % positif, RPR moyen = 8,5 ; lot de réactifs 2 – 100 % positif, RPR moyen = 8,3). Les valeurs RPR de 8,5 et 8,3 pour le MMB sont corrélées à une clonalité de 1,0 % à 2,5 %, conformément au tableau des normes clonales. Ainsi, la LdD pour l'*IGH* clan II est déterminée comme étant une clonalité de 2,5 %.
- 12.4.2.3. Le % de dilution le plus bas où le % positif ≥ 95 % observé pour l'*IGH* clan III est la dilution à 1,0 % avec MMC (100 % positif, RPR moyen = 6,3) avec les deux lots de réactifs. À l'aide du tableau des normes de clonalité, un RPR de 6,3 se situe dans une plage de valeurs RPR qui correspondent à une plage de clonalité de 0,5 % à 1,0 %. Par conséquent, la LdD pour l'*IGH* clan III est déterminée comme une clonalité de 1,0 %.

- 12.4.3. Étant donné que la LdD pour les *IGH* clans I, II et III a été déterminée comme étant une clonalité de 2,5 %, 2,5 % et 1 %, et l'application d'une approche conservatrice, la LdD globale du test est déterminée comme étant de 2,5 %.

Tableau 13. Résumé des résultats de LdD pour le lot de réactifs 1

Clan	% de dilution	MMA			MMB			MMC		
		N valides	% pos	RPR moyen	N valides	% pos	RPR moyen	N valides	% pos	RPR moyen
S. O.	0,0	19	0	1,4	20	0	1,4	20	0	1,4
I	0,1	20	0	1,4	20	0	1,4	20	0	1,4
	0,3	20	0	1,3	20	0	1,4	20	0	1,3
	1,0	18	50,0	3,0	19	89,5	3,8	20	95,0	4,1
	3,0	20	100,0	10,2	20	100,0	13,3	20	100,0	12,9
	10,0	19	100,0	40,3	20	100,0	52,7	20	100,0	45,9
	30,0	20	100,0	91,4	20	100,0	144,5	20	100,0	111,2
II	0,1	20	0	1,4	20	0	1,5	20	0	1,4
	0,3	20	0	1,3	20	0	1,6	20	0	1,4
	1,0	19	0	1,3	20	50,0	2,9	20	0	1,3
	3,0	19	0	1,9	20	100,0	8,5	20	0	1,4
	10,0	20	100,0	6,9	20	100,0	30,7	19	0	1,3
	30,0	20	100,0	28,8	20	100,0	99	20	0	1,3
III	0,1	20	0	1,4	20	0	1,4	20	0	1,3
	0,3	20	0	2,0	20	0	1,5	20	0	1,9
	1,0	20	100,0	5,8	20	95,0	4,4	19	100,0	6,3
	3,0	20	100,0	17,5	19	100,0	14	20	100,0	19,2
	10,0	20	100,0	59,3	20	100,0	52,8	20	100,0	67,6
	30,0	20	100,0	113,9	20	100,0	132,5	20	100,0	147,4

Tableau 14. Résumé des résultats de LdD pour le lot de réactifs 2

Clan <i>IGH</i>	% de dilution	MMA				MMB				MMC			
		N valide	N clonal	% pos	RPR moyen	N valide	N clonal	% pos	RPR moyen	N valide	N clonal	% pos	RPR moyen
S. O.	0,0	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,4
I	0,1	20	0	0,0	1,3	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,3
	0,3	20	0	0,0	1,3	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,5
	1,0	20	10	50,0	3,0	19	16	84,2	3,8	19	17	89,5	3,9
	3,0	18	18	100,0	9,9	20	20	100,0	12,8	20	20	100,0	13,2
	10,0	20	20	100,0	37,4	20	20	100,0	53,7	19	19	100,0	46,3
	30,0	20	20	100,0	90,4	20	20	100,0	118,7	20	20	100,0	114,9
II	0,1	20	0	0,0	1,3	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,4
	0,3	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,6	20	0	0,0	1,4
	1,0	20	0	0,0	1,3	20	10	50,0	3,1	20	0	0,0	1,4
	3,0	20	0	0,0	1,7	20	20	100,0	8,3	20	0	0,0	1,4
	10,0	20	20	100,0	6,5	20	20	100,0	28,9	19	0	0,0	1,3
	30,0	20	20	100,0	28,3	20	20	100,0	82,8	20	0	0,0	1,4
III	0,1	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,3	20	0	0,0	1,4
	0,3	20	0	0,0	2,1	20	0	0,0	1,7	20	0	0,0	2,1
	1,0	19	19	100,0	6,1	19	18	94,7	5,2	20	20	100,0	6,3
	3,0	20	20	100,0	18,7	20	20	100,0	14,6	20	20	100,0	18,9
	10,0	19	19	100,0	65,9	20	20	100,0	54,3	20	20	100,0	63,7
	30,0	20	20	100,0	133,9	20	20	100,0	125,7	20	20	100,0	131,5

12.5. Spécificité analytique : Substances interférentes

- 12.5.1. Cette conception de l'étude était basée sur les normes EP07-A3 et EP37-Ed1 du CLSI et comprend l'évaluation de l'effet de 6 substances différentes, potentiellement interférentes, lorsqu'elles sont présentes dans l'échantillon testé avec le test IdentiClone Dx *IGH* Assay. Les substances testées étaient la bilirubine, l'hémoglobine, le cholestérol, l'EDTA, le triglycéride et l'éthanol à 70 %, qui ont été ensemencés dans des échantillons d'ADNg après l'extraction, car l'introduction potentielle de cette substance dans le flux de travail du test se produirait après l'extraction de l'ADNg. Sinon, les autres substances ont été ensemencées dans des échantillons de SP frais avant l'extraction de l'ADNg.
- 12.5.2. Au total, 24 échantillons de sang périphérique frais (jamais congelés) anticoagulés dans des échantillons EDTA provenant de donneurs normaux (négatifs/non clonaux) ou de donneurs lymphoprolifératifs à cellules B diagnostiqués (positifs/clonaux) ont été utilisés dans cette étude et conservés entre 2 °C et 8 °C jusqu'à 7 jours avant l'extraction de l'ADNg. Chaque échantillon a été testé en double, non ensemencé ou ensemencé, comprenant 10 échantillons clonaux par substance et 5 échantillons non clonaux par substance. Cette étude a été menée sur 2 lots de réactifs, sur plusieurs instruments ABI3500xL Dx, par plusieurs opérateurs sur plusieurs jours.
- 12.5.3. Les résultats de cette étude sont fournis dans le Tableau 15 et ne démontrent aucune interférence par les 6 substances aux concentrations testées. Tous les échantillons ont généré l'état de clonalité attendu (clonal ou non clonal) lorsqu'ils ont été testés non ensemencé contre ensemencé. En particulier, chaque substance interférente a testé 5 échantillons non clonaux et 10 échantillons clonaux, à l'exception du cholestérol. Le cholestérol a été testé avec 5 échantillons non clonaux et 11 échantillons clonaux et chaque échantillon non ensemencé et ensemencé a été testé en double. Au total, 30 résultats de clonage ont été déterminés pour chaque substance interférente avant et après l'ensemencement, à l'exception du cholestérol (32 résultats finaux). Tous les résultats de l'état de clonalité générés par les échantillons ensemencés étaient concordants avec les résultats de l'état de clonalité générés par les échantillons correspondants non ensemencés, ce qui démontre que les substances testées n'ont pas imposé d'interférence au test à la concentration testée. La limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % pour le % de concordance pour chaque substance interférente était égale ou supérieure à 88,4 %. (Tableau 15)

Tableau 15. Pourcentage de concordance de l'identification finale non ensemencé par rapport à la substance interférente

Substance interférente (concentration finale du test)	Type d'échantillon	N	Total des résultats de test		Résultat concordant total ²	% de concordance (IC à 95 %) ³
			Non ensemencé	Ensemencé		
Cholestérol (4,0 mg/ml)	Non clonal	5	32	32	32	100,0 %
	Clonal	11				(89,1–100,0)
Triglycérides (15,0 mg/ml)	Non clonal	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal	10				(88,4 à 100,0)
Hémoglobine (100 mg/ml)	Non clonal	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal	10				(88,4 à 100,0)
Bilirubine (0,4 mg/ml)	Non clonal	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal	10				(88,4 à 100,0)
EDTA (5,4 mg/ml)	Non clonal	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal	10				(88,4 à 100,0)
Éthanol à 70 % (10 % v/v)	Non clonal	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal	10				(88,4 à 100,0)

¹Deux réplicats par échantillon testé avant et après l'ensemencement avec des substances interférentes.

²Résultats de test ensemencé correspondant au résultat de test non ensemencé correspondant des mêmes échantillons.

³Méthode de l'intervalle de confiance exact de Clopper-Pearson.

12.6. Spécificité analytique : Contamination par transfert/contamination croisée

- 12.6.1. Cette étude a évalué le taux de contamination par transfert et de contamination croisée pendant le flux de travail du test IdentiClone Dx *IGH* Assay lors de la configuration de la PCR et de l'analyse des fragments d'électrophorèse capillaire. Des tests ont été effectués sur 106 échantillons négatifs artificiels pour le transfert et sur 126 échantillons négatifs artificiels pour la contamination croisée. Des échantillons négatifs artificiels (non clonaux) ont été préparés avec de l'ADN de contrôle polyclonal à 100 % IVS-0000 ; des échantillons positifs artificiels (clonaux) ont été préparés avec de l'ADN de contrôle clonal à 100 % IVS-0019.
- 12.6.2. La disposition de la plaque se compose d'échantillons positifs et négatifs alternés dans un motif en damier, conçu pour maximiser l'occurrence du transfert et de la contamination croisée. Ces échantillons ont été amplifiés avec le mélange mère A (MMA), choisi comme mélange mère représentatif, car la contamination dépend du signal de l'amplicon et non du mélange mère. Les tests ont été effectués sur plusieurs plaques avec des dispositions d'échantillons alternées sur 2 analyseurs génétiques ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer différents, par 1 opérateur, avec 1 lot de réactifs, sur plusieurs jours.
- 12.6.3. Avant d'effectuer une fragmentation par électrophorèse capillaire sur des échantillons de test, une référence a été établie en analysant une plaque composée d'une solution Liz/HIDI dans l'instrument pour confirmer l'absence de tout signal de contamination présent dans les études précédentes. La contamination par transfert a été évaluée à l'aide des données générées par des échantillons négatifs provenant de plaques composées de la même disposition d'échantillons (10 injections au total, 106 échantillons négatifs combinés). Les 105 résultats d'échantillons négatifs qui ont donné lieu à une évaluation de contamination par transfert ont tous généré des résultats non clonaux, et le pourcentage de fausse définition dues à la contamination par transfert est de 0,0 % (0/105), avec un IC à 95 % inférieur de 96,5 %. La contamination croisée a été évaluée à l'aide de données générées à partir d'échantillons négatifs provenant de plaques contenant une disposition d'échantillon alternative (par rapport à celles évaluées pour la contamination par transfert) ; 12 injections au total, 126 échantillons négatifs combinés ; le pourcentage de faux résultats dus à une contamination croisée est de 0,0 % (0/125), avec un IC à 95 % inférieur de 97,1 %. Sur les 129 résultats d'échantillons positifs, tous étaient clonaux, à l'exception de 2 résultats indéterminés, qui ont tous deux généré des pics de RFU élevés, par rapport à d'autres échantillons positifs, et ont été déterminés comme étant valides et potentiellement contaminants. Les résultats des échantillons positifs sur deux instruments ont généré une valeur RPR moyenne de 100,4, et la valeur RPR moyenne des résultats d'échantillons négatifs sur deux instruments qui ont été qualifiés pour l'évaluation de la contamination par transfert et la contamination croisée était de 1,2 et 1,2, respectivement. (Tableau 16)

Tableau 16. Valeurs RPR moyennes par instrument ABI

Type	Instrument ABI	N	RPR moyenne	%CV
Clonal	1	65	97,8	30,2
	2	62	103,2	36,3
	Combiné	127	100,4	33,5
Reporté (Non clonal)	1	63	1,2	4,3
	2	62	1,2	5,0
	Combiné	125	1,2	4,6
Contamination croisée (Non clonal)	1	53	1,2	4,3
	2	52	1,2	4,8
	Combiné	105	1,2	4,6

12.7. Spécificité analytique : Étude de précision intra-laboratoire

- 12.7.1. La précision du test IdentiClone Dx *IGH* Assay a été déterminée en testant le même panel d'échantillons par 3 opérateurs, sur 3 instruments utilisant 3 lots de réactifs, sur 20 jours. Le panel d'échantillons se composait d'un échantillon négatif d'ADNg, préparé à partir d'un groupe d'échantillons cliniques négatifs, et de 6 échantillons positifs, préparés à partir d'un échantillon clinique positif d'ADNg mélangé à un échantillon clinique négatif groupé d'ADNg à 1,5 fois la LdD et 3 fois la LdD. Chaque échantillon du panel a été testé en triple et les tests ont été effectués à au moins 20 jours d'intervalle.
- 12.7.2. Tous les résultats des tests du panel correspondaient au résultat de clonage attendu (100,0 %). L'échantillon négatif a généré des résultats non clonaux dans tous les réplicats (100,0 %). Les échantillons faiblement positifs (1,5 fois la LdD) ont généré des résultats clonaux dans tous les réplicats (100,0 %), et les échantillons fortement positifs ont également généré des résultats clonaux dans tous les réplicats (100,0 %). Le %CV de la valeur RPR produite par chaque mélange mère est fourni dans le Tableau 17, et le %CV de la valeur RPR généré par les échantillons faiblement positifs avec les mélanges mère Clonal est indiqué ci-dessous.
- 12.7.2.1. Valeur RPR pour MMA, le %CV observé était de 12,2 %
- 12.7.2.2. Valeur RPR pour MMB, le %CV observé était de 10,5 %
- 12.7.2.3. Valeur RPR pour MMC, le %CV observé était de 8,5 %
- 12.7.3. La variation totale, entre l'opérateur, les instruments, les lots de réactifs et la variation intra-série est présentée dans le Tableau 17.
- 12.7.3.1. Les résultats du facteur Lot ont produit la plus grande variabilité intra-série pour tous les échantillons (variabilité moyenne = 7,9 % ; minimum = 0 % et maximum = 42,3 %).
- 12.7.3.2. Les résultats du facteur Opérateur ont généré une moyenne de 3,1 % (minimum = 0 % et maximum = 21,7 %).
- 12.7.3.3. Le pourcentage de variance attribué à l'instrument ABI présentait une variance moyenne de 2,2 % (minimum = 0 % et maximum = 8,5 %).
- 12.7.3.4. Les résultats du facteur Intrinsèque sont attribués à une variance moyenne de 86,9 % (minimum = 55,4 % et maximum = 99,9 %).
- 12.7.4. Dans l'ensemble, tous les résultats du test d'échantillon correspondaient au résultat de clonage attendu (100,0 %). La valeur RPR %CV était ≤ 25 pour les échantillons faiblement positifs avec MMA, MMB et MMC, respectivement, sur 3 opérateurs, 3 instruments et 3 lots de réactifs.

Tableau 17. Variabilité de la précision du test (intra-laboratoire)

CP	MM	N valides	RPR moyen	Type de variation				Variation totale	
				Interopérateurs	Inter-instruments	Inter-lots de réactifs	Intrasérie	ET	%CV
PM1	A	52	1,59	0,08 (7,7 %)	0,07 (5,9 %)	0,05 (3,3 %)	0,26 (83,2 %)	0,28	17,7
	B	53	1,67	0,00 (0,0 %)	0,05 (3,3 %)	0,06 (3,7 %)	0,28 (93,0 %)	0,29	17,2
	C	54	1,52	0,06 (7,1 %)	0,04 (3,4 %)	0,06 (5,2 %)	0,22 (84,3 %)	0,24	16,0
PM2	A	54	16,49	0,72 (12,8 %)	0,00 (0,0 %)	1,02 (25,7 %)	1,58 (61,5 %)	2,02	12,2
	B	54	22,09	0,00 (0,0 %)	0,05 (0,1 %)	0,00 (0,0 %)	2,16 (99,9 %)	2,16	9,8
	C	54	1,40	0,00 (0,0 %)	0,05 (8,5 %)	0,00 (0,0 %)	0,17 (91,5 %)	0,17	12,4

Tableau 17. Variabilité de la précision du test (intra-laboratoire)

CP	MM	N valides	RPR moyen	Type de variation				Variation totale	
				Interopérateurs	Inter-instruments	Inter-lots de réactifs	Intrasérie	ET	%CV
PM3	A	54	1,32	0,02 (1,3 %)	0,01 (0,5 %)	0,00 (0,0 %)	0,18 (98,2 %)	0,18	13,4
	B	53	23,57	0,20 (0,7 %)	0,60 (5,9 %)	1,53 (38,0 %)	1,84 (55,4 %)	2,47	10,5
	C	53	1,38	0,04 (5,6 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,16 (94,4 %)	0,17	12,1
PM4	A	53	25,94	0,56 (1,4 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	4,72 (98,6 %)	4,76	18,3
	B	54	42,10	0,14 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	2,41 (13,8 %)	6,04 (86,2 %)	6,50	15,4
	C	52	37,59	0,00 (0,0 %)	0,41 (1,6 %)	0,00 (0,0 %)	3,17 (98,4 %)	3,20	8,5
PM5	A	54	33,44	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	2,05 (12,4 %)	5,46 (87,6 %)	5,83	17,4
	B	54	49,18	0,00 (0,0 %)	0,78 (2,3 %)	0,00 (0,0 %)	5,03 (97,7 %)	5,09	10,4
	C	54	1,39	0,00 (0,0 %)	0,03 (2,2 %)	0,00 (0,0 %)	0,18 (97,8 %)	0,18	13,1
PM6	A	52	1,34	0,01 (1,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,14 (99,0 %)	0,14	10,6
	B	54	10,82	0,27 (6,3 %)	0,00 (0,0 %)	0,40 (14,4 %)	0,95 (79,3 %)	1,06	9,8
	C	54	1,37	0,00 (0,0 %)	0,04 (5,1 %)	0,00 (0,0 %)	0,16 (94,9 %)	0,17	12,1
PM7	A	54	54,44	0,00 (0,0 %)	1,97 (3,6 %)	0,00 (0,0 %)	10,13 (96,4 %)	10,32	19,0
	B	54	93,12	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	10,30 (42,3 %)	12,02 (57,7 %)	15,83	17,0
	C	53	77,58	4,16 (21,7 %)	1,52 (2,9 %)	2,12 (5,7 %)	7,46 (69,7 %)	8,93	11,5

12.8. Précision de la mesure : Étude de reproductibilité multisites

- 12.8.1. L'objectif de cette étude était de déterminer si le test IdentiClone Dx *IGH* Assay fonctionne comme prévu lorsqu'il est testé dans 3 centres distincts. L'analyse a été menée sur un panel contenant 6 échantillons positifs (3 positifs faibles et 3 positifs moyens) et un échantillon négatif avec le dispositif expérimental en triple en utilisant 1 lot de réactifs par 2 opérateurs dans 3 sites d'analyse différents sur 5 cas d'analyse différents. L'échantillon négatif du panel a été préparé à partir d'un groupe d'échantillons cliniques d'ADNg précédemment déterminé comme non clonal pour l'*IGH*, et les échantillons positifs du panel étaient l'ADNg de l'échantillon clinique (précédemment déterminé comme clonal pour l'*IGH*) mélangé à l'ADNg de l'échantillon clinique regroupé négatif à 1,5 fois la LdD (faiblement positif) et 3 fois la LdD (moyennement positif).
- 12.8.2. L'échantillon négatif du panel a produit des résultats non clonaux dans les trois centres dans tous les cas valides (100,0 %, 88/88). Les échantillons du panel faiblement et moyennement positifs ont produit des résultats clonaux sur les trois sites dans tous les cas valides (respectivement 100,0 %, 90/90 et 100,0 %, 90/90). La variation totale des valeurs RPR dues au site, à l'opérateur, à l'instance, intra-série et à la valeur %CV RPR pour chaque membre du panel est indiquée dans le Tableau 18 (mélange mère dominant avec la RPR la plus élevée uniquement pour les CP positives, les trois mélanges mères pour les CP négatives).
- 12.8.3. Dans l'ensemble, le pourcentage de variance attribué au site avait une moyenne de 15,4 % et une plage de 0,0 % à 50,9 %.
- 12.8.3.1. Le pourcentage de variance attribué à l'opérateur avait une moyenne de 0,5 % et une plage de 0,0 % à 4,3 %.
- 12.8.3.2. Le pourcentage de variance attribué à l'instance de test avait une moyenne de 9,9 % et une plage de 0,0 % à 20,8 %.
- 12.8.3.3. Le pourcentage de variance attribué à la phase intra-série avait une moyenne de 75,5 % et une plage de 31,7 % à 100,0 %, respectivement.

Tableau 18. Variabilité de précision inter-sites du test IdentiClone Dx *IGH* Assay par valeur RPR

Type de contrôle	MM	N	Résumé des statistiques			Type de variation				Variation totale	
			Min	Moyenne	Max	Intersites	Interopérateurs	Interinstances ¹	Intrasérie	ET	%CV
Faiblement positif	A	88	7,00	22,91	29,70	0,00 (0,0 %)	0,04 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	3,44 (100 %)	3,44	15,0
	B	90	15,10	20,16	27,00	0,78 (10,0 %)	0,00 (0,0 %)	1,09 (19,6 %)	2,07 (70,4 %)	2,47	12,2
	C	90	31,10	54,81	72,10	2,40 (10,0 %)	0,43 (0,3 %)	3,07 (16,4 %)	6,50 (73,3 %)	7,59	13,8

Tableau 18. Variabilité de précision inter-sites du test IdentiClone Dx *IGH* Assay par valeur RPR

Type de contrôle	MM	N	Résumé des statistiques			Type de variation				Variation totale	
			Min	Moyenne	Max	Intersites	Interopérateurs	Interinstances ¹	Intrasérie	ET	%CV
Moyenne-ment positif	A	90	30,00	48,81	75,60	4,71 (35,1 %)	0,00 (0,0 %)	2,13 (7,2 %)	6,04 (57,7 %)	7,95	16,3
	B	90	26,00	38,83	59,10	2,77 (20,3 %)	0,00 (0,0 %)	2,80 (20,8 %)	4,72 (58,9 %)	6,15	15,8
	C	89	34,30	98,63	141,4	17,36 (50,9 %)	5,06 (4,3 %)	8,80 (13,1 %)	13,69 (31,7 %)	24,32	24,7
Négatif	A	88	1,10	1,46	2,00	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,07 (12,3 %)	0,20 (87,7 %)	0,21	14,4
	B	90	1,10	1,43	2,30	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,21 (100 %)	0,21	15,0
	C	90	1,10	1,43	1,90	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,18 (100 %)	0,18	12,5

¹Cas de test ; pour chaque site, il y en avait 5.

12.9. Validation du flux de travail du test : Étude d'extraction d'ADN

12.9.1. Cette étude fournit des preuves objectives que trois méthodes courantes d'extraction d'ADN génomique (ADNg) disponibles dans le commerce génèrent une quantité suffisante d'ADNg pour le test IdentiClone Dx *IGH* Assay. Trois (3) méthodes d'extraction différentes disponibles sur le marché ont été évaluées : 1) isolation de la colonne de silice, 2) extraction automatisée par billes magnétiques (à l'aide du King Fisher Flex), et 3) précipitation ont été utilisées pour extraire l'ADNg de l'échantillon de sang périphérique prélevé sur EDTA auprès de 2 donneurs uniques ayant reçu un diagnostic lymphoprolifératif des cellules B (clonal) et 8 donneurs sains uniques (non clonal). Le Tableau 19 répertorie les kits par fournisseur et par méthode d'extraction.

Tableau 19 : Kits d'extraction par méthode d'extraction

Méthode	Nom du kit	Fournisseur	Méthode d'extraction
1	QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIA)	QIAGEN :	Membrane en silice
2	Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PWIZ)	Promega	Précipitation
3	MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2,0 kit (KFF)	Thermo Fisher Scientific	Bille magnétique

12.9.2. Les échantillons ont été extraits en suivant les instructions du fabricant associées, et l'ADNg résultant a été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS et d'un NanoDrop 2000. Après la quantification, l'ADNg (1 réplicat par méthode d'extraction) a été testé avec le test IdentiClone Dx *IGH* Assay ; l'analyse des données a été effectuée dans les 48 heures suivant l'extraction.

12.9.3. Il a été démontré que les trois méthodes d'extraction généraient une quantité requise d'ADNg pour le test, dans laquelle chaque échantillon générait ≥ 250 ng d'ADNg, quelle que soit la méthode d'extraction. La quantité totale d'ADNg a été calculée à partir de la moyenne de 3 réplicats de résultats Nanodrop pour chacun des 10 échantillons, pour chaque méthode d'extraction. (Tableau 20) Différents volumes ont été utilisés pour répondre aux exigences de chaque kit d'extraction :

12.9.3.1. Le kit PWIZ a nécessité 300 μ l de sang périphérique et d'ADNg a été élué dans 100 μ l, ce qui a généré une plage de 6 846,7 ng à 26 336,7 ng d'ADNg total

12.9.3.2. Le kit QIA a nécessité 200 μ l de sang périphérique et l'ADNg a été élué dans 50 μ l, produisant une plage de 2 656,7 ng à 10 963,3 ng d'ADNg total

12.9.3.3. Le kit KFF a nécessité 300 μ l de sang périphérique et l'ADNg a été élué dans 50 μ l, produisant une plage de 6 795,0 ng à 33 338,3 ng d'ADNg total

Tableau 20 : Résumé de l'extraction d'ADNg total

N° d'échantillon	QIA ADNg total (ng)	Concentration moyenne en ADNg QIA (ng/ μ L)	PWIZ ADNg total (ng)	PWIZ ADNg moyen Concentration (ng/ μ l)	KFF ADNg total (ng)	KFF ADNg moyen Concentration (ng/ μ l)
1	7 230,0	144,6	19 163,3	191,6	22 101,7	442,0
2	3 651,7	73,0	7 593,3	75,9	10 471,7	209,4
3	2 656,7	53,1	6 846,7	68,5	8 313,3	166,3

Tableau 20 : Résumé de l'extraction d'ADNg total

N° d'échantillon	QIA ADNg total (ng)	Concentration moyenne en ADNg QIA (ng/μL)	PWIZ ADNg total (ng)	PWIZ ADNg moyen Concentration (ng/μl)	KFF ADNg total (ng)	KFF ADNg moyen Concentration (ng/μl)
4	4 238,3	84,8	9 586,7	95,9	9 535,0	190,7
5	4 908,3	98,2	13 496,7	135,0	14 426,7	288,5
6	5 496,7	109,9	13 506,7	135,1	16 171,7	323,4
7	3 981,7	79,6	11 896,7	119,0	14 963,3	299,3
8	4 403,3	88,1	11 990,0	119,9	6 975,0	139,5
9	8 776,7	175,5	17 043,3	170,4	20 606,7	412,1
10	10 963,3	219,3	26 336,7	263,4	33 338,3	666,8

12.9.4. Les 30 réplicats (10 échantillons testés avec 3 méthodes d'extraction) ont généré au moins 250 ng d'ADNg (30/30, avec une limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % \geq 80 %). L'ADNg total récupéré des méthodes PWIZ et KFF était similaire, car le même volume d'entrée de sang périphérique (300 μl) par extraction a été utilisé, par rapport à l'analyse QIA, qui utilisait un volume d'entrée de sang périphérique plus faible (200 μl). Lorsqu'il a été testé avec le test IdentiClone Dx *IGH* Assay, l'ADNg extrait a présenté des valeurs RPR (%CV compris entre 1 % et 21 %) et des résultats de mélange mère concordants pour les trois méthodes d'extraction. (Tableau 21) Le traitement de l'échantillon (y compris l'extraction de l'ADN) jusqu'au résultat (y compris l'analyse des données) a nécessité 28 heures ou moins pour tous les échantillons.

Tableau 21 : Résumé des résultats du test IdentiClone Dx *IGH* Assay à partir des 3 méthodes d'extraction

Échantillon	MM ou global	RPR QIA	RPR PWIZ	RPR KFF	%CV
PM1	A	1,5	1,5	1,3	7 %
	B	1,6	1,8	1,2	16 %
	C	1,4	1,3	1,4	3 %
	Global	Non clonal	Non clonal	Non clonal	S. O.
PM2	A	Erreur QT*	1,4	1,3	4 %
	B	1,3	1,3	1,5	7 %
	C	1,8	1,1	1,4	20 %
	Global	S. O.	Non clonal	Non clonal	S. O.
PM3	A	1,3	1,6	1,5	9 %
	B	1,5	1,1	1,6	15 %
	C	1,8	1,2	1,2	20 %
	Global	Non clonal	Non clonal	Non clonal	S. O.
PM4	A	Non valide	1,2	1,4	8 %
	B	1,8	1,4	1,4	12 %
	C	1,2	1,4	1,3	6 %
	Global	S. O.	Non clonal	Non clonal	S. O.
PM5	A	1,5	1,4	1,2	9 %
	B	1,4	1,1	1,5	13 %
	C	1,2	1,2	1,1	4 %
	Global	Non clonal	Non clonal	Non clonal	S. O.
PM6	A	1,6	1,2	1,2	14 %
	B	1,2	1,5	Non valide	11 %
	C	1,4	1,6	1,6	6 %
	Global	Non clonal	Non clonal	S. O.	S. O.

Tableau 21 : Résumé des résultats du test IdentiClone Dx *IGH* Assay à partir des 3 méthodes d'extraction

Échantillon	MM ou global	RPR QIA	RPR PWIZ	RPR KFF	%CV
PM7	A	1,2	1,3	1,6	12 %
	B	1,5	1,7	1,3	11 %
	C	1,7	1,4	1,2	14 %
	Global	Non clonal	Non clonal	Non clonal	S. O.
PM8	A	1,3	1,2	Non valide	4 %
	B	1,5	1,7	1,5	6 %
	C	1,3	1,3	1,6	10 %
	Global	Non clonal	Non clonal	S. O.	S. O.
PM9	A	1,7	1,3	1,6	11 %
	B	66,3	112,8	86,9	21 %
	C	76,5	65,9	71,5	6 %
	Global	Clonal	Clonal	Clonal	S. O.
PM10	A	145,9	185,7	165,9	10 %
	B	196,7	192,6	196,9	1 %
	C	233,2	199,1	216,5	6 %
	Global	Clonal	Clonal	Clonal	S. O.

*N'a pas été retesté.

S. O. = sans objet

12.10. Validation du flux de travail du test : Étude de l'ADN de départ

- 12.10.1. L'objectif de cette étude est de fournir des preuves objectives des exigences relatives à l'ADNg de départ pour le test IdentiClone Dx *IGH* Assay. L'évaluation de 5 quantités différentes d'ADNg (500 ng, 250 ng, 200 ng, 125 ng et 25 ng) a été effectuée sur 10 échantillons cliniques (5 avec un diagnostic clinique positif et 5 avec un diagnostic clinique négatif de lymphoprolifération des lymphocytes B) avec le test IdentiClone Dx *IGH* Assay. La concentration de tous les échantillons d'ADNg a été mesurée à l'aide du même spectrophotomètre Nanodrop 2000. Les tests ont été effectués en double sur 6 séries, sur 1 instrument ABI 3500xL Dx, par 1 opérateur en utilisant 1 lot de réactifs, sur plusieurs jours.
- 12.10.2. Sur les 100 résultats possibles d'état de clonalité (10 échantillons testés en double pour 5 conditions d'entrée différentes), 96 résultats globaux (en utilisant les 3 mélanges mères). Les 4 échantillons qui n'ont pas généré de résultats globaux contenaient le niveau d'ADN de départ le plus bas (25 ng), dans lequel les réplicats présentaient des résultats non valides en raison d'une faible amplification dans un ou plusieurs mélanges mères. La cause probable de ces résultats non valides est une quantité insuffisante d'ADN ajouté ; par conséquent, ces résultats non valides n'ont pas été retestés. Sur les 96 résultats globaux générés, 95 étaient concordants avec les résultats attendus ; la concordance globale est de 99,0 % ; le Tableau 22 fournit la concordance du résultat de l'état de clonalité par membre du panel et le niveau d'ADN ajouté. L'unique (1) résultat discordant s'est produit dans la CP09, qui contenait le niveau d'entrée d'ADN le plus bas (25 ng) ; un réplicat de cet échantillon attendu du panel non clonal a généré un résultat « clonal » avec le mélange mère B, générant une valeur RPR de 3,2, ce qui est supérieur au seuil du test de 3,0. Ce résultat discordant était potentiellement dû à la faible quantité d'ADN ajoutée, qui peut avoir réduit le RFU du pic de fond (dénominateur pour le calcul du RPR) plus que le RFU du pic le plus élevé (numérateur pour le calcul du RPR), gonflant artificiellement le RPR pour être légèrement au-dessus du RPR seuil de 3,0. Sur les 20 résultats d'état de clonalité générés avec l'ADN ajouté prévu (250 ng), tous étaient concordants avec les résultats attendus. La concordance globale des résultats pour le niveau d'ADN ajouté prévu est de 100,0 %.

Tableau 22 : Concordance globale des résultats

Échantillon du panel	Clonalité attendue	Concordance globale des résultats				
		500 ng	250 ng (Prévu)	200 ng	125 ng	25 ng
PM01	Clonal	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM02	Clonal	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM03	Clonal	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)

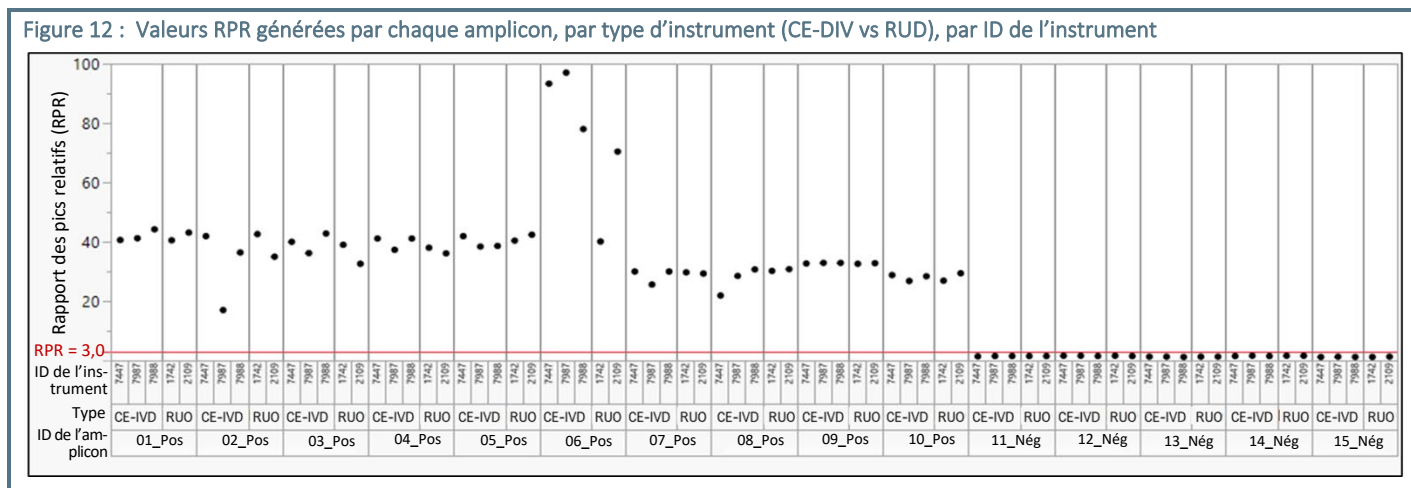
Tableau 22 : Concordance globale des résultats

Échantillon du panel	Clonalité attendue	Concordance globale des résultats				
		500 ng	250 ng (Prévu)	200 ng	125 ng	25 ng
PM04	Clonal	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM05	Clonal	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM06	Non clonal	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	S. O.
PM07	Non clonal	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	S. O.
PM08	Non clonal	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM09	Non clonal	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	50 % (1/2)
PM10	Non clonal	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
Global		100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	93,8 % (15/16)

12.11. Validation du flux de travail du test : Équivalence : 3500xL contre 3500xL Dx

- 12.11.1. Cette étude démontre que les résultats du test IdentiClone Dx *IGH* Assay sont équivalents lorsqu'ils sont obtenus en utilisant deux versions différentes d'un instrument similaire :
- 12.11.1.1. L'analyseur génétique (RUO) Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer et
- 12.11.1.2. L'Analyseur génétique Applied Biosystems 3500xL Dx Genetic Analyzer (CE-DIV)
- 12.11.2. Des échantillons comprenant 15 amplicons de 10 échantillons clonaux et 5 échantillons non clonaux (en plus des amplicons des contrôles de série associés) et ont été testés avec le test IdentiClone Dx *IGH* Assay sur 5 instruments ABI 3500 différents (2 RUO et 3 CE-DIV) chacun.
- 12.11.3. Au total, 75 résultats valides ont été générés par les 5 instruments différents (15 amplicons x 1 réplicat x 5 instruments). Ces résultats ont été évalués de manière plus approfondie pour calculer les valeurs relatives du rapport des pics (RPR), les résultats de l'état de clonalité, le RPR moyen par type d'instrument et la différence RPR moyenne entre les types d'instruments. (Figure 12)
- 12.11.4. Les résultats de test générés avec les 15 amplicons (10 clonaux/positifs et 5 non clonaux/négatifs) concordent à 100 % avec les résultats attendus sur les 5 instruments. Les valeurs RPR générées par les amplicons positifs variaient de 17,0 à 97,0, et les valeurs RPR générées par les amplicons négatifs variaient de 1,2 à 1,6. Une différence maximale de 61,9 % a été calculée à partir des valeurs RPR moyennes générées par les différents instruments ; cependant, cela peut être attribué à un résultat de test RUD « aberrant », qui a généré une valeur RPR significativement inférieure, par rapport aux résultats des quatre autres instruments (40,1, contre 70,4, 78,0, 93,3, 97,0 et 78,0, respectivement). Étant donné que cet amplicon est fortement positif (clonalité élevée en pourcentage), il est peu probable qu'il cause une différence dans le résultat de l'état clonal lorsqu'il est testé sur un type d'instrument par rapport à l'autre. La différence en pourcentage la plus élevée observée pour les amplicons positifs et négatifs restants était de 18,1 % et 4,2 %, respectivement. Dans l'ensemble, les résultats concordants à 100,0 % produits par les 5 instruments différents démontrent que les performances du test IdentiClone Dx *IGH* Assay sur les analyseurs génétiques ABI 3500xL Dx et ABI 3500xL Genetic Analyzer sont équivalentes.

Figure 12 : Valeurs RPR générées par chaque amplicon, par type d'instrument (CE-DIV vs RUO), par ID de l'instrument



12.12. Validation clinique

12.12.1. Présentation de l'étude pivot de précision clinique

12.12.1.1. Cette étude pivot de précision a été conçue pour évaluer l'équivalence des performances cliniques entre le test IdentiClone Dx *IGH* Assay (le dispositif expérimental) et un dispositif pronostique sur l'ADN rétrospectif et résiduel désidentifié extrait d'échantillons de sang périphérique (SP) provenant de personnes suspectées d'avoir des lymphoproliférations des lymphocytes B. Le dispositif pronostique est un test DIV disponible dans le commerce (au moment de l'étude), qui applique le NGS pour détecter les réarrangements clonaux du gène *IGH* (test de référence), avec une utilisation prévue similaire au dispositif expérimental, le test IdentiClone Dx *IGH* Assay, sur le même type d'échantillon.

12.12.1.2. Le test IdentiClone Dx *IGH* Assay a été développé par Invivoscribe en tant que dispositif de diagnostic *in vitro* destiné à la détection qualitative par électrophorèse capillaire des réarrangements du gène clonal des immunoglobulines à chaîne lourde (*IGH*) dans l'ADN génomique extrait du sang périphérique de patients présentant des lymphoproliférations suspectées. Le test de référence utilise la technologie NGS pour identifier les réarrangements clonaux *IGH* V_H - J_H, les séquences d'ADN de la région V_H - J_H associées et la distribution de fréquence de l'utilisation des segments de la région V_H et J_H.

12.12.2. Objectifs de l'étude

12.12.2.1. Les objectifs de cette étude pivot de précision étaient de 1) établir une concordance entre les résultats du test IdentiClone Dx *IGH* Assay et du test de référence en évaluant le pourcentage de concordance positive et négative entre les deux tests et 2) estimer la relation entre les diagnostics de la maladie et la détection de la clonalité.

12.12.3. Population de patients

12.12.3.1. Au total, 303 échantillons ont été inclus dans l'étude ; cependant, 54 échantillons n'étaient pas éligibles pour une comparaison entre le test de référence et le dispositif d'investigation (test *IGH* IdentiClone Dx *IGH* Assay). Parmi ceux-ci, 4 échantillons n'ont pas été expédiés au centre de test, et 50 échantillons étaient soit « Quantity Not Sufficient » (Quantité insuffisante, QNS), soit présentaient des résultats qui n'étaient pas évaluables avec au moins un test, les rendant inaptes à l'inclusion dans l'analyse comparative. Les 249 échantillons restants comprenaient deux populations d'analyse, 1) un ensemble d'analyse *avec* des patients sains (n = 249), qui comprenait de l'ADN provenant de sang périphérique de patients suspectés d'être atteints d'une maladie lymphoproliférative avec des résultats négatifs de clonalité des lymphocytes B ou de l'ADN extrait d'échantillons de sang périphérique sains normaux et 2) un ensemble d'analyse *sans* patients sains (n = 203), qui comprenait des échantillons d'ADN provenant de patients ayant reçu un diagnostic de maladie lymphoproliférative des lymphocytes B.

12.12.3.1.1. Tous les patients (échantillons) recrutés dans l'étude ont été inclus dans le groupe d'inclusion (SE). L'analyse de concordance entre le test IdentiClone Dx *IGH* Assay et le test de référence utilisait la population ES.

12.12.3.1.2. L'ensemble d'analyse principal (Primary Analysis Set, PAS) comprend des échantillons de la population présentant des résultats positifs, négatifs ou non valides/indéterminés provenant des résultats du test IdentiClone Dx *IGH* Assay et des résultats positifs ou négatifs de la méthode de référence.

12.12.4. Sélection des patients et des aliquotes pour le test IdentiClone Dx *IGH* Assay

12.12.4.1. La conception de l'étude utilisait des échantillons d'ADN restants anonymisés provenant d'essais cliniques et, par conséquent, était exemptée de la nécessité de consentements individuels des patients.

12.12.4.2. Un seul échantillon par patient a été inclus dans le groupe d'analyse final utilisé pour évaluer les objectifs principaux.

12.12.5. Analyse de l'innocuité du test

12.12.5.1. Le test IdentiClone Dx *IGH* Assay ne devrait pas présenter de risque direct pour la sécurité du patient et aucune décision thérapeutique n'a été prise sur la base des résultats du test IdentiClone Dx *IGH* Assay.

12.12.6. Efficacité

12.12.6.1. Validation clinique primaire du test IdentiClone Dx *IGH* Assay

12.12.6.1.1. L'objectif principal de cette étude clinique établit une concordance entre le dispositif expérimental (test *IGH* IdentiClone Dx *IGH* Assay) et un test de référence (un test DIV disponible dans le commerce [au moment de l'étude] qui applique le NGS pour détecter les réarrangements clonaux du gène *IGH*, avec une utilisation prévue similaire au dispositif expérimental).

12.12.6.1.2. La concordance entre le dispositif expérimental (IdentiClone Dx *IGH* Assay) et les résultats de clonage du test de référence est affichée dans le Tableau 23. Parmi les 249 échantillons évaluables susceptibles d'être évalués par la méthode de référence, 243 ont rapporté le même résultat par les deux méthodes.

Tableau 23 : Concordance entre le test IdentiClone Dx *IGH* Assay (IUO) et le test de référence (DIV), y compris les patients en bonne santé

IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay (IUO)	Test de référence (IVD)		
	+	-	Total
+	129	1	130
-	5	114	119
Total	134	115	249

- 12.12.6.1.3. Le Tableau 24 détaille la concordance basée sur la conformité entre les résultats de clonage du test IdentiClone Dx *IGH* Assay (IUO) et du test de référence basé sur le NGS (DIV). Parmi les 249 échantillons évaluables testés, 114 des 115 échantillons négatifs (-) étaient concordants entre les deux méthodes, 129 des 134 échantillons positifs (+) étaient concordants, pour un PCN de 99,1 % et un PCP de 96,3 %. La limite inférieure de l'intervalle de confiance (IC) à 95 % pour le PCN est de 95,3 % tandis que la limite inférieure de l'IC à 95 % pour le PCP est de 91,5 % ; le Tableau 24 détaille la concordance entre le dispositif expérimental et la méthode de référence. Les rapports de vraisemblance positifs et négatifs sont fournis dans le Tableau 25.

Tableau 24 : Concordance entre le dispositif expérimental et le test de référence

Mesure de la concordance	Pourcentage de concordance (n/N)	IC à 95 % ¹
PCN	99,1 % (114/115)	(95,3 %, 100,0 %)
PCP	96,3 % (129/134)	(91,5 %, 98,8 %)

¹L'IC à 95 % est calculé à l'aide de la méthode dite exacte de Clopper-Pearson

Tableau 25 : Rapport de probabilité entre le test IdentiClone Dx *IGH* Assay et le test de référence (DIV), y compris les patients en bonne santé

Rapport de vraisemblance positive	Rapport de vraisemblance négative
110,709	0,038

- 12.12.6.1.4. Tableau 26 présente la concordance entre les résultats de clonage du dispositif expérimental et du test de référence *sans* patients sains. Parmi les 203 échantillons évaluables susceptibles d'être évalués par la méthode de référence, 197 ont rapporté le même résultat par les deux méthodes.

Tableau 26 : Concordance entre le test IdentiClone Dx *IGH* Assay (IUO) et le test de référence (DIV) à l'exclusion des patients en bonne santé

IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay (IUO)	Test de référence basé sur le NGS (DIV)		
	+	-	Total
+	128	1	129
-	5	69	74
Total	133	70	203

- 12.12.6.1.1. La concordance est basée sur la concordance entre le dispositif expérimental et le test de référence, à l'exclusion des patients sains (Tableau 27). Parmi les 203 échantillons évaluables testés, 69 des 70 échantillons négatifs (-) étaient concordants entre les deux méthodes, 128 des 134 échantillons positifs (+) étaient concordants, pour un PCN de 98,6 % et un PCP de 96,2 %. La limite inférieure de l'IC à 95 % pour le PCN est de 92,3 % tandis que la limite inférieure de l'IC à 95 % pour le PCP est de 91,4 %. Les rapports de vraisemblance positifs et négatifs sont fournis dans le Tableau 28.

Tableau 27 : Concordance entre le test IdentiClone Dx *IGH* Assay (IUO) et le test de référence (DIV), à l'exclusion des patients en bonne santé

Mesure de la concordance	Pourcentage de concordance (n/N)	IC à 95 % ¹
PCN	98,6 % (69/70)	(92,3 %, 100,0 %)
PCP	96,2 % (128/133)	(91,4 %, 98,8 %)

¹L'IC à 95 % est calculé à l'aide de la méthode dite exacte de Clopper-Pearson


Tableau 28 : Rapport de vraisemblance entre le test IdentiClone Dx *IGH* Assay et le test de référence (DIV), à l'exclusion des patients en bonne santé

Rapport de vraisemblance positive	Rapport de vraisemblance négative
67,368	0,038

12.12.7. Conclusions

- 12.12.7.1. Cette évaluation clinique du test IdentiClone Dx *IGH* Assay confirme que le dispositif expérimental détecte avec précision les événements clonaux dans le gène de chaîne lourde des immunoglobulines (*IGH*).
- 12.12.7.2. Cette étude pivot de précision fournit des preuves documentées que le dispositif expérimental et la méthode de référence (dispositif de référence) présentent des taux de détection similaires pour les événements clonaux de l'*IGH*. Les objectifs principaux de concordance ont été fixés à 70 % d'une limite inférieure d'un IC à 95 % pour le PCN et le PCP, car ces deux technologies sont assez différentes. Cependant, les résultats de l'essai démontrent que ces deux technologies identifient des événements clonaux à un taux très similaire.
- 12.12.7.3. L'ADN résiduel désidentifié extrait d'échantillons de sang périphérique (SP) de personnes présentant des troubles lymphoprolifératifs des lymphocytes B suspectés a été testé par les deux méthodes. Un sous-ensemble de 249 échantillons a généré des résultats évaluable avec les deux tests et le critère d'acceptation de l'étude a été satisfait :
 - 12.12.7.3.1. La limite inférieure de l'IC exact à 95 % du PCN devait être supérieure ou égale à 70 %. La limite inférieure atteinte était de 95 %.
 - 12.12.7.3.1.1. La spécificité diagnostique a été calculée à 0,991.
 - 12.12.7.3.1.2. Rapport de vraisemblance négative : 0,038
 - 12.12.7.3.2. La limite inférieure de l'IC exact à 95 % PCP était supérieure ou égale à 70 %. La limite inférieure atteinte était de 92 %.
 - 12.12.7.3.2.1. Sensibilité diagnostique calculée à 0,963.
 - 12.12.7.3.2.2. Rapport de vraisemblance positive : 110,709
- 12.12.7.4. La méthode expérimentale a donné un résultat faussement positif et cinq résultats faussement négatifs.
- 12.12.7.5. Cette évaluation clinique du test IdentiClone Dx *IGH* Assay confirme que le dispositif expérimental détecte avec précision les événements clonaux dans le gène *IGH*.
- 12.12.7.6. Aucun problème de sécurité n'a été identifié pendant l'exécution de cette étude.

13. Bibliographie

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. "Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2024; 74:229–263.
2. Siegel RL, Miller KD, and Jemal A. "Cancer Statistics, 2020." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2020; 70:7-30.
3. Cowan AJ, Allen C, Barac A, et al. "Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." *Journal of American Medicine*, 2018 Sep; 4(9):1221-1227.
4. Miller JE, et al. "An automated semiquantitative B- and T-cell clonality assay." *Molecular Diagnostics*, 1999; 4(2):101-117.
5. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, et al. "Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936." *Leukemia*, 2004 Jan; 17(12):2257–2317.
6. Van Krieken JHJM, Langerak AW, Macintyre EA, et al. "Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936." *Leukemia*, 2007 Feb; 21(2):201-206.
7. Evans PAS, Pott Ch, Groenen PJTA, et al. "Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936." *Leukemia*, 2007 Mar; 21(2):207-214.
8. Hongxiang L, Bench AJ, Bacon CM, et al. "A practical strategy for the routine use of BIOMED-2 PCR assays for detection of B- and T-cell clonality in diagnostic haematopathology." *British Journal of Haematology*, 2007 Jul; 138(1):31-43.
9. Langerak AW, Groenen PTJA, Brüggemann M, et al. (2012) "EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations." *Leukemia*, 2012 Aug; 26(10):2159-2171.
10. Berget E, Helgeland L, Molven A, and Ventermyr, OK. "Detection of clonality in follicular lymphoma using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples and BIOMED-2 immunoglobulin primers." *Journal of Clinical Pathology*, 2011; 64:37-41.
11. Hongxin F and Robetorye RS. "Detection of clonal immunoglobulin heavy chain gene rearrangements by the polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis." *Methods in Molecular Biology*, 2013; 999:151-167.
12. Kokovic I, Novakovic BJ, Cerkovnik P, and Navakovic S. "Clonality analysis of lymphoid proliferations using the BIOMED-2 clonality assays: a single institution experience." *Radiology and Oncology*, 2014 Jun; 48(2):155-162.
13. Roepman P, Boots C-M, Scheidel KC, et al. "Molecular clonality assessment shows high performance to predict malignant B-cell non-Hodgkin's lymphoma using cytological smears." *Journal of Clinical Pathology*, Published Online First: [12 May 2016] doi:10.1136/jclinpath-2016-203757
14. Zhang J-J, Xie Y-X, Luo L-L, et al. "A comparison of capillary electrophoresis and next-generation sequencing in the detection of immunoglobulin heavy chain H and light chain κ gene rearrangements in the diagnosis of classic hodgkin's lymphoma." *Bioengineered*, 2022; 13:3, 5868-5879.
15. Kirkham PM, Martari F, Newton JA and Schroeder HW. "Immunoglobulin VH clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding." *The EMBO Journal*, 1992; 11(2):603-609.
 - IdentiClone Dx IGH Software Instructions for Use – English (Invivoscribe : 310000)
 - ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer User Manual (Thermo Fisher: 100079380 Revision D)
 - ABI 3500xL Genetic Analyzer User Manual (Thermo Fisher: 4401661 Revision C)

14. Support technique et service client

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.

Invivoscribe, Inc

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










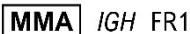

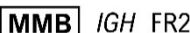

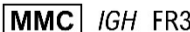







Site Web : www.invivoscribe.com | Heures d'ouverture : 7 h à 17 h heure du Pacifique

Téléphone : +1 858 224-6600 | Fax : +1 858 224-6601

Service technique : support@invivoscribe.com | Service client : sales@invivoscribe.com

15. Symboles

Les symboles suivants sont utilisés pour l'étiquetage de ce produit.

	Référence catalogue		ADN polymérase Taq
	Volume de réactif		Contrôle positif <i>IGH</i>
	Numéro de lot		Contrôle négatif
	Conditions de conservation		Contrôle sans matrice (NTC)
	Identifiant unique du dispositif		MMA <i>IGH</i> FR1 (mélange mère A)
	Date de péremption		MMB <i>IGH</i> FR2 (mélange mère B)
	Protéger de la lumière		MMC <i>IGH</i> FR3 (mélange mère C)
	Fabricant		Consulter les instructions d'utilisation
	Conformité européenne		Mandataire Suisse
	Destiné au diagnostic <i>in vitro</i>		Mandataire au sein de l'Union européenne
			Personne responsable au Royaume-Uni

16. Informations légales

Pour les informations légales relatives à ce produit, consulter : <https://invivoscribe.com/legal-notice/>

17. Historique des révisions

Tableau 29 : Historique des révisions du mode d'emploi et validation de l'organisme notifié du test IdentiClone Dx *IGH* Assay

Révision du mode d'emploi	Date de publication	Description de la modification	Révision validée par l'organisme notifié
H	Décembre 2025	Publication initiale pour soumission à l'organisme notifié.	<input checked="" type="checkbox"/> Oui Langue de validation : Anglais <input type="checkbox"/> Non