

Mode d'emploi du kit *ipsogen*® IDH1 RGQ PCR

IVD

Pour une utilisation en diagnostic in vitro

À utiliser avec l'instrument Rotor-Gene Q® MDx 5plex HRM

À utiliser avec le QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit

Ce mode d'emploi s'applique à :

**REF****Version**Kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR

24 échantillons

675223

Version 1



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

Table des matières

1. Utilisation prévue	4
2. Utilisateur prévu	5
3. Description et principe	6
3.1. Résumé et explications	6
3.2. Principe de la procédure	7
3.3. Plateforme et logiciel	11
4. Matériel fourni	12
4.1. Contenu du kit	12
4.2. Composants du kit	13
5. Matériel nécessaire, mais non fourni	16
5.1. Réactifs supplémentaires	16
5.2. Consommables	16
5.3. Équipement	16
6. Avertissements et précautions	18
6.1. Avertissements	18
6.2. Informations de sécurité	18
6.3. Précautions	19
7. Mise au rebut	21
8. Stockage et manipulation	22
8.1. Stockage et manipulation des réactifs	22
8.2. Stockage et manipulation des échantillons	23
9. Protocole : Préparation des échantillons	25
10. Protocole : détection des mutations IDH1	28
10.1. Étapes préliminaires	29
11. Interprétation des résultats	49
12. Limitations	56
13. Caractéristiques de performances	58
13.1. Performances analytiques	58
13.2. Performances cliniques	71

13.3. Utilité/efficacité clinique du kit ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit avec le traitement par TIBSOVO en association avec l'azacitidine dans la LAM nouvellement diagnostiquée	73
13.4. Concordance clinique	75
13.5. Efficacité clinique	75
13.6. Résumé de la sécurité et des performances	78
14. Références	79
15. Guide de résolution de problèmes	80
16. Symboles	82
17. Coordonnées	84
18. Informations sur les commandes	85
19. Historique des révisions du document	87

1. Utilisation prévue

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit est un test de PCR en temps réel qualitatif destiné à la détection de variants mononucléotidiques (SNV) codant cinq mutations IDH1 (R132C, R132H, R132G, R132S et R132L), à partir d'ADN génomique extrait d'échantillons humains de sang total ou d'aspirat de moelle osseuse, frais ou congelés, prélevés dans des tubes K2-EDTA chez des patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (AML).

Le test est destiné à être utilisé comme dispositif de diagnostic compagnon pour aider les cliniciens à identifier les patients atteints de AML qui pourraient être éligibles à un traitement par TIBSOVO® (ivosidénib) sur la base de la détection d'une mutation IDH1. TIBSOVO peut être administré en association avec l'azacitidine, conformément à ses indications approuvées. Le test n'est pas destiné à orienter les décisions de traitement par l'azacitidine.

Les échantillons humains de sang total ou d'aspirat de moelle osseuse, frais ou congelés, prélevés dans des tubes K2-EDTA, sont traités manuellement à l'aide du kit QIAamp DSP DNA Blood Mini.

L'instrument QIAGEN® Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM est utilisé pour l'amplification et la détection automatisées.

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit n'est pas un dispositif automatisé ; toutefois, l'analyse est assistée par un logiciel dédié.

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit est destiné à être utilisé par un personnel formé dans un environnement de laboratoire professionnel.

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit est destiné à un usage de diagnostic in vitro.

2. Utilisateur prévu

À utiliser avec le kit QIAamp DSP DNA Blood Mini (réf. n° : 61104) en utilisant la procédure manuelle d'isolement et de purification de l'ADN génomique par microcentrifugation.

Le produit doit être utilisé exclusivement par un personnel qualifié dans un environnement de laboratoire professionnel.

3. Description et principe

3.1. Résumé et explications

L'isocitrate déshydrogénase 1 est une enzyme codée par le gène IDH1 situé sur le chromosome 2 chez l'humain. Les isocitrate déshydrogénases de type sauvage catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en 2-oxoglutarate. Les mutations de points chauds (hotspots) de l'IDH1 au niveau de R132 entraînent des mutations avec gain de fonction qui aboutissent à la production de D-2-hydroxyglutarate (2HG) (1). Le 2HG est un oncométabolite impliqué dans l'hyperméthylation de l'ADN et des histones, entraînant une dérégulation de la transcription génique et un blocage de la différenciation cellulaire (2, 3). Les mutations d'IDH1 sont présentes dans les hémopathies malignes, principalement dans l'AML (environ 15–25 %) (4), mais aussi dans les syndromes myélodysplasiques (MDS, environ 2–7 %) (5, 6).

L'*ipsogen*® IDH1 RGQ PCR Kit est un test destiné à la détection et à l'identification de cinq mutations spécifiques au sein du codon 132 du gène IDH1 (Tableau 1).

Tableau 1. Liste des mutations et des identifiants COSMIC

Mutation	Changement de base	COSMIC ID*
R132H	395G>A	COSV61615239
R132C	394C>T	COSV61615256
R132S	394C>A	COSV61615649
R132G	394C>G	COSV61615456
R132L	395G>T	COSV61615420

* Les identifiants COSMIC sont issus du *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (7) (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

3.2. Principe de la procédure

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit repose sur la détection par amplification sélective de cinq mutations IDH1 dans l'ADN génomique (ADNg) extrait d'échantillons de sang total ou d'aspirat de moelle osseuse (BMA). La technologie allèle-spécifique permet une détection précise et hautement reproductible des mutations IDH1 cibles, grâce à l'utilisation de jeux d'amorces sens et antisens et de sondes spécifiques ; les amorces spécifiques à la mutation se lient sélectivement à l'ADN cible, ce qui favorise l'élongation et l'amplification lors de la réaction PCR.

Les rapports de résultats sont entièrement automatisés. Si les contrôles de la série et les résultats des échantillons sont valides, et si l'amplification de la cible du dosage est inférieure au seuil critique prédéterminé, le rapport affichera la ou les mutations IDH1 détectées dans chaque échantillon.

3.2.1. Purification de l'ADN

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit a été validé pour une utilisation avec de l'ADN extrait d'échantillons de sang total et de ponction-aspiration de moelle osseuse (BMA) à l'aide du kit QIAamp® DSP DNA Blood Mini, en suivant la procédure d'isolement et de purification manuelle de l'ADN génomique par microcentrifugation. N'utilisez aucun autre produit d'extraction d'ADN et n'utilisez ni le QIAcube® ni de systèmes sous vide pour extraire l'ADN avec le QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

La procédure manuelle par microcentrifugation du kit QIAamp DSP DNA Blood Mini comprend 4 étapes. Les échantillons sont d'abord lysés dans des conditions dénaturantes à haute température. La lyse est réalisée en présence de QIAGEN® Protease (QP) et de tampon de lyse (AL). Chaque lysat est ensuite appliqué sur une colonne de centrifugation QIAamp Mini, et l'ADN génomique est adsorbé sur la membrane de silice à mesure que le lysat traverse la membrane sous l'effet de la force centrifuge. Pendant que l'ADN génomique reste

lié à la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini, les contaminants sont éliminés efficacement à l'aide de tampons de lavage. Enfin, l'ADN génomique est élué de la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini à l'aide de 200 µL de tampon d'éluion (AE). L'ADN élué est prêt à être utilisé avec l'*ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

3.2.2. PCR en temps réel

L'utilisation de la PCR en temps réel permet de détecter les produits de réaction pendant la phase exponentielle du processus d'amplification par PCR, plutôt qu'à son terme, comme c'est le cas avec la PCR en point final. Cela améliore la spécificité du test et réduit le temps nécessaire à sa réalisation.

Le test utilise le principe de réaction d'hydrolyse des oligonucléotides par PCR en temps réel avec des sondes TaqMan®. Trois types d'oligonucléotides sont utilisés pour détecter chaque séquence de bases cible : une paire d'amorces de PCR conventionnelles, qui sont complémentaires de séquences en amont et en aval de la séquence cible et forment un amplicon de PCR, ainsi qu'une sonde moléculaire qui est complémentaire de la séquence cible précise et comprend à la fois un rapporteur fluorescent et un désactivateur de fluorescence à proximité immédiate.

Pendant la PCR, si la séquence cible d'intérêt est présente, la sonde oligonucléotidique s'y hybride, tandis que les amorces de PCR s'hybrident avec leurs séquences complémentaires en amont et en aval de la région de fixation de la sonde. Lors de la phase d'élongation de la réaction, l'activité exonucléase 5' vers 3' de l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (Taq) clive la sonde oligonucléotidique, libérant à la fois le rapporteur fluorescent et les molécules du désactivateur. À mesure que ces derniers se diffusent les uns des autres dans la solution, l'effet du désactivateur sur le rapporteur diminue, ce qui entraîne une augmentation de la fluorescence détectable. Ce processus se produit à chaque cycle de PCR et n'interfère pas avec l'accumulation exponentielle du produit (Figure 1).

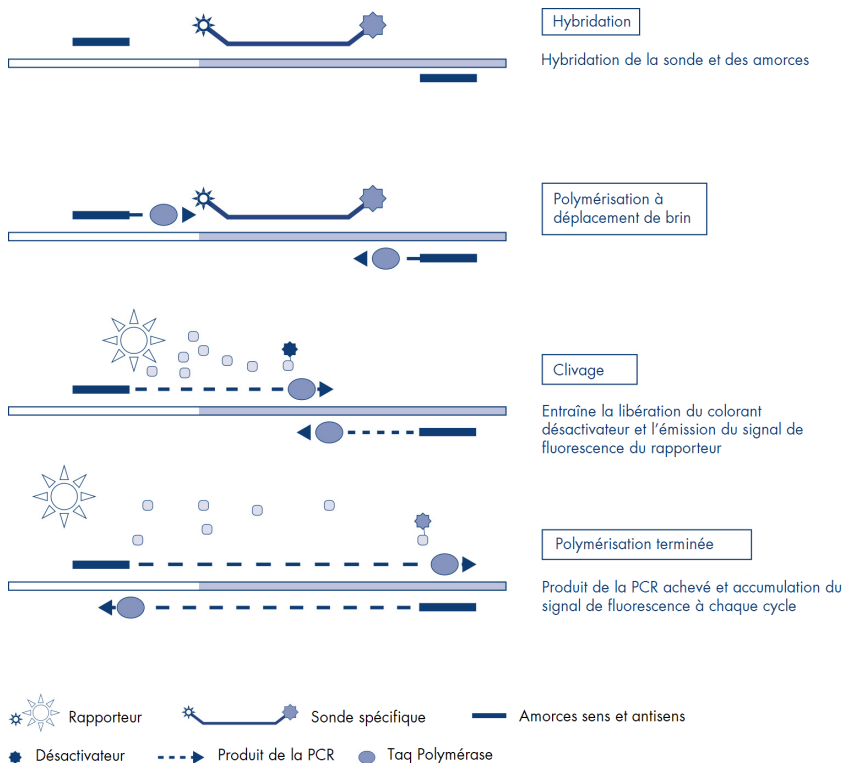


Figure 1. Principe de la réaction TaqMan en temps réel.

L'augmentation du signal de fluorescence n'est détectée que si la séquence cible, qui est complémentaire des amorces et de la sonde, est présente dans la réaction. Si la séquence cible est absente, le clivage de la sonde n'a pas lieu, le marqueur fluorescent ne se dissocie pas du quencher et donc aucune fluorescence n'est observée.

Le nombre de cycles de PCR nécessaires pour détecter un signal fluorescent au-dessus d'un seuil prédéterminé est appelé cycle seuil (Ct) et est directement proportionnel à la quantité de

cible présente au début de la réaction, ce qui permet de définir une limite de sensibilité pour le test.

Chaque test de mutation IDH1 contient une amorce allèle-spécifique qui se lie sélectivement aux séquences d'ADN contenant la mutation. Une non-concordance à l'extrémité 3' de l'amorce allèle-spécifique (par exemple, en présence d'une séquence de type sauvage ou d'une mutation différente) réduit l'efficacité de l'extension de l'amorce, augmentant ainsi la spécificité pour la mutation désignée.

La spécificité pour les mutations IDH1 R132 est encore accrue par l'utilisation de bloqueurs de PCR. Des oligonucléotides complémentaires de la séquence d'ADN de type sauvage sont inclus dans les mélanges réactionnels de PCR. En présence d'ADN de type sauvage, les bloqueurs d'oligonucléotides s'hybrident sélectivement à l'ADN et inhibent la reconnaissance des séquences de type sauvage par les amorces spécifiques de l'allèle mutant.

Le *kit ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit contient l'ADN polymérase HotStarTaq®, une forme modifiée de l'ADN polymérase Taq de QIAGEN. Elle est fournie à l'état inactif et ne possède aucune activité enzymatique à température ambiante. La formation de produits mal amorcés et de dimères d'amorce est ainsi évitée pendant la préparation de la réaction et la première étape de dénaturation. Il n'y a donc pas de consommation des réactifs de la PCR par des artefacts, ce qui permet d'obtenir une spécificité PCR élevée. L'enzyme est activée au début de la réaction par une étape d'incubation de 15 minutes à 95 °C. Ce démarrage à chaud permet de préparer rapidement et facilement les réactions à température ambiante.

3.3. Plateforme et logiciel

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit est spécifiquement conçu pour être utilisé avec :

- Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM Platform* (réf. n°. 9002032 [plateforme] ou 9002033 [système]), fonctionnant avec un ordinateur personnel sur lequel est installé :
 - Logiciel Rotor-Gene AssayManager® v2.1 (version 2.1.1 ou ultérieure) (réf. n°. 9024203)
 - Gamma Plug-in version 1.0 (ou ultérieure) (réf. n°. 9025511)
 - Profil d'essai *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit (« AP_ipsogen_IDH1_Blood_BMA_V1_0_x.iap » où $x \geq 0$)

Note : le profil d'essai *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit est uniquement compatible avec Rotor-Gene AssayManager v2.1 (ou ultérieure).

Reportez-vous aux manuels d'utilisation individuels correspondants pour obtenir des informations concernant l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application ou le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in.

L'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM doit être entretenu conformément aux exigences du manuel d'utilisation.

Important : avant utilisation, assurez-vous que les instruments ont été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

*Avant utilisation, s'assurer que les instruments ont été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

4. Matériel fourni

4.1 . Contenu du kit

<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit			
Numéro de référence			675223
Nombre de tests			24
Réactif	Couleur de bouchon	Identifiant du tube	Volume
IDH1 Reaction Mix 1 (Mélange réactionnel IDH1 1)	Vert	IDH1 Mix 1 (Mélange IDH1 1)	950 µL
IDH1 Reaction Mix 2 (Mélange réactionnel IDH1 2)	Violet	IDH1 Mix 2 (Mélange IDH1 2)	950 µL
IDH1 Positive Control (Contrôle positif IDH1)	Rouge	PC	120 µL
Taq DNA polimerase (ADN polymérase Taq)	Menthe	Taq	85 µL
Water for NTC (Eau pour témoin négatif)	Blanc	NTC	1,9 mL
Water for sample dilution (Eau pour dilution de l'échantillon)	Blanc	Dil. (Dilution)	1,9 mL

Aucun accessoire n'est fourni avec le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

4.2. Composants du kit

Réactif	Composant(s) critique(s) / actif(s) / réactif(s)	Gamme de concentrations
IDH1 Reaction Mix 1 (Mélange réactionnel IDH1 1) et IDH1 Reaction Mix 2 (Mélange réactionnel IDH1 2)	Oligonucléotides spécifiques de la cible : amorces	0,1–1 µM
	Oligonucléotides spécifiques de la cible : sondes de détection marquées par un fluorophore	0,1–1 µM
	Bloqueur de PCR oligonucléotidique IDH1	0,1–2 µM
	Désoxynucléotides triphosphates (dNTP)	< 1 mM
IDH1 Positive Control (Contrôle positif IDH1)	Plasmides d'ADN contenant des séquences spécifiques de la cible	< 100 000 copies/µL
Taq DNA polymérase (ADN polymérase Taq)	ADN polymérase Taq	1–10 unités

Remarque : le dispositif contient des composants supplémentaires susceptibles d'influencer les mesures.

4.2.1. Mélanges réactionnels

Les mélanges réactionnels IDH1 Reaction Mix 1 et IDH1 Reaction Mix 2 contiennent des réactifs permettant d'effectuer des réactions PCR qui détectent les mutations IDH1 indiquées dans le Tableau 1.

Chaque mélange réactionnel permet également l'amplification d'une réaction de contrôle, comme décrit ci-dessous.

4.2.2. Réaction de contrôle

La réaction de contrôle utilise une amorce sens et antisens ainsi qu'une sonde marquée pour détecter l'amplification d'une séquence conservée non-IDH1. La réaction de contrôle est utilisée pour déterminer si une quantité appropriée d'ADN amplifiable est présente dans l'échantillon et constitue un facteur dans les calculs analytiques déterminant le statut mutationnel.

La cible de contrôle est utilisée pour définir un échantillon comme présentant une mutation IDH1 détectée ou aucune mutation détectée, et comme contrôle de chargement de l'ADN. Tous les échantillons produiront un signal dans la réaction de contrôle dans une plage de Ct prédéfinie si une quantité suffisante d'ADN a été ajoutée au tube de réaction.

4.2.3. IDH1 Positive Control (Contrôle positif IDH1)

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit contient également le contrôle positif IDH1. Le contrôle positif est un mélange de plasmides d'ADN représentant chacune des mutations détectées par le kit. La détection du contrôle positif confirme le bon fonctionnement de chacun des mélanges réactionnels du kit.

4.2.4. Contrôle négatif

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit contient de l'eau exempte de nucléase pour le témoin négatif (tube pour témoin négatif) à utiliser pour la réaction « témoin négatif ». Le témoin négatif permet d'évaluer une contamination potentielle lors de la préparation du test.

4.2.5. ADN polymérase Taq

L'ADN polymérase Taq est l'enzyme utilisée pour la réaction de polymérisation en chaîne par l'*ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

4.2.6. Eau pour dilution de l'échantillon

Un tube supplémentaire contenant de l'eau exempte de nucléase est utilisé, si nécessaire, pour diluer l'ADNg trop concentré pour l'*ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

5. Matériel nécessaire, mais non fourni

5.1. Réactifs supplémentaires

- QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (réf. n°. 61104, voir la section « Purification de l'ADN »)
- Solutions de décontamination de l'ADN DNAZap™ ou solutions de nettoyage équivalentes
- Désinfectant de laboratoire de haut niveau Distel et solution de lavage à l'alcool isopropylique (IPA) ou solution de nettoyage équivalente

5.2. Consommables

- Barrettes de tubes et bouchons (0,1 mL), pour utilisation avec un 72-Well Rotor (réf. n°. 981103 ou 981106)
- Tubes de microcentrifugation exempts de nucléase, à faible fixation d'ADN pour la préparation des mélanges maîtres
- Cônes de pipette exempts de nucléase munis de dispositifs anti-aérosol

5.3. Équipement

- Plateforme et logiciel tels que décrits à la page "Plateforme et logiciel" à la page 11
- Marqueur permanent
- Pipettes dédiées* (adaptables) pour la préparation des échantillons
- Pipettes dédiées* (adaptables) pour la préparation du Master Mix PCR

* Avant l'utilisation, assurez-vous que les instruments ont été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

- Pipettes dédiées* (adaptables) pour la distribution de l'ADN matriciel
- Centrifugeuse de paillasse* avec rotor pour tubes de 1,5 mL
- Thermomixer*, incubateur orbital chauffant*, bloc chauffant* ou bain-marie* capable d'incuber à 37 °C et 56 °C
- Bloc de chargement de 72 tubes de 0,1 mL, bloc en aluminium pour la préparation manuelle des réactions (réf. n°. 9018901)
- 72-Well Rotor, pour supporter les barrettes de tubes et bouchons de 0,1 mL, avec des volumes réactionnels de 10–50 µL ; nécessite un Locking Ring 72-Well Rotor
- Locking Ring 72-Well Rotor, pour bloquer les barrettes de tubes et bouchons de 0,1 mL dans le 72-Well Rotor (réf. n°. 9018904)
- Instrument de quantification par spectrophotométrie*
- Agitateur de type vortex de paillasse

* Avant l'utilisation, assurez-vous que les instruments ont été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

6. Avertissements et précautions

Veillez noter que vous pouvez être tenu de consulter les réglementations locales pour signaler les incidents graves survenus en relation avec l'instrument au fabricant et/ou à son représentant autorisé et à l'autorité réglementaire dans laquelle l'utilisateur et/ou le patient est établi.

6.1. Avertissements

Pour une utilisation en diagnostic in vitro.

À utiliser avec le Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform.

À utiliser avec le kit QIAamp DSP DNA Blood Mini en suivant la procédure manuelle d'isolement et de purification de l'ADN génomique par microcentrifugation.

6.2. Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, portez systématiquement un sarrau de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, veillez à consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF pratique et compact à l'adresse www.qiagen.com/safety, où il est possible de consulter et d'imprimer les FDS de chaque kit et composant de kit QIAGEN.

- Les prélèvements et les échantillons sont potentiellement infectieux. Éliminez les déchets d'échantillon et d'analyse conformément aux procédures de sécurité locales.
- Pour toute information de sécurité concernant l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, reportez-vous au manuel d'utilisation fourni avec l'instrument.

- Pour les informations relatives à la sécurité du kit QIAamp DSP DNA Blood Mini (réf. n°. 61104), consultez le *Manuel du kit QIAamp DSP DNA Blood Mini*.

6.2.1. Informations d'urgence

CHEMTREC

En dehors des États-Unis et du Canada +1 703-527-3887

6.3. Précautions

L'utilisateur doit toujours respecter les précautions suivantes lors de l'utilisation du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit :

ADN polymérase Taq



Contient : éthoxylate de nonylphénol. Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Évitez tout rejet dans l'environnement. Portez des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. Recueillez le produit répandu. Mettez au rebut le contenu/récipient dans une installation agréée conformément aux réglementations locales, régionales, nationales et internationales.

- Le test est destiné à être utilisé avec des échantillons de sang total ou d'aspirat de moelle osseuse recueillis dans des tubes K2-EDTA.
- Tous les produits chimiques et biologiques sont potentiellement dangereux. Les prélèvements et échantillons sont potentiellement infectieux et doivent être traités comme du matériel présentant un risque biologique.
- Jetez les échantillons et les dosages usagés conformément aux procédures de sécurité locales.
- Les réactifs pour le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit sont dilués de manière optimale. N'effectuez aucune dilution supplémentaire des réactifs, cela pourrait compromettre les

performances. N'utilisez pas de volumes réactionnels (mélange de réactions + échantillon) inférieurs à 25 µl.

- Tous les réactifs contenus dans le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit sont formulés spécifiquement pour être utilisés avec les tests fournis dans le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.
- Tous les réactifs fournis dans le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans le même kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit. Ne substituez pas les réactifs au sein d'un kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ou entre différents kits *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kits, car cela peut affecter les performances.
- Utilisez exclusivement l'ADN polymérase Taq (tube Taq) fournie dans le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit. Ne la remplacez pas par de l'ADN polymérase Taq d'autres kits du même type ou de tout autre type, ni par de l'ADN polymérase Taq d'un autre fournisseur.
- Reportez-vous au *Manuel d'utilisation du Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform* pour obtenir des avertissements, des précautions et des procédures supplémentaires.
- Installez l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM conformément aux procédures d'installation et aux exigences du site.
- N'utilisez pas de composants périmés ou mal stockés.
- Faites preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination des réactifs des mélanges réactionnel et de contrôle avec le matériel synthétique contenu dans le réactif de contrôle positif.
- Faites preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination croisée entre les échantillons. Bouchez les tubes rapidement après l'ajout de chaque échantillon.
- Décontaminez soigneusement le bloc de chargement avant de l'utiliser pour la préparation des mélanges maîtres. L'utilisation de solutions de dégradation de l'ADN PCR DNAZap suivie du désinfectant de laboratoire de haut niveau Distel et d'un lavage à l'IPA est recommandée. Le bloc de chargement doit être sec avant utilisation.

- Utilisez des pipettes individuelles dédiées pour préparer les mélanges réactionnels et ajouter les réactifs de contrôle positif.
- Effectuez la préparation et la distribution des mélanges réactionnels dans une zone séparée de celle de l'ajout du contrôle positif.
- Les molécules marquées par fluorescence contenues dans les réactifs du mélange réactionnel sont sensibles à la lumière. Placez les réactifs du contrôle et du mélange réactionnel à l'abri de la lumière afin d'éviter tout photoblanchiment.
- N'ouvrez pas l'instrument Rotor-Gene Q MDx avant la fin de l'analyse.
- N'ouvrez pas les tubes Rotor-Gene Q une fois le cycle terminé. Si une erreur survient pendant l'analyse, les échantillons présents dans l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM doivent être éliminés et ne doivent pas être analysés à nouveau.
- Une attention toute particulière doit être accordée pour garantir un test correct des échantillons en évitant les mauvaises introductions d'échantillons ou autres erreurs de chargement ou de pipetage.
- Afin de minimiser les messages d'alerte pour les contrôles et les échantillons, il convient de respecter strictement le *mode d'emploi du kit ipsogen IDH1 RGQ PCR*, y compris, mais sans s'y limiter, les consignes suivantes :
 - Un mélange correct des réactifs est requis et doit être assuré à chaque étape de mélange lors de la préparation de l'analyse.

7. Mise au rebut

Jetez les échantillons et les dosages usagés conformément aux procédures de sécurité locales.

8. Stockage et manipulation

8.1. Stockage et manipulation des réactifs

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit est expédié sous carboglace et doit être encore congelé à son arrivée. Si le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit n'est pas congelé à l'arrivée, si l'emballage extérieur a été ouvert pendant le transport ou si l'envoi ne contient pas de bon de livraison ou de réactifs, veuillez contacter le support technique de QIAGEN ou vos distributeurs locaux (consultez www.qiagen.com).

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit doit être conservé immédiatement après réception entre -30 °C et -15 °C dans un congélateur à température constante. Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit doit être protégé de la lumière pour éviter tout photoblanchiment et toute perte de performance. Lorsqu'il est conservé dans les conditions spécifiées, le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit est stable jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'emballage extérieur.

Dans ces conditions, les composants sont stables pendant 11 mois sans présenter de réduction de performance ou de qualité, sauf indication contraire sur l'étiquette.

Éviter les cycles de congélation et décongélation à répétition. Ne pas dépasser un maximum de 3 cycles de congélation-décongélation sur une période maximale de 90 jours. Les réactifs doivent être entièrement décongelés à température ambiante ($15\text{--}25\text{ °C}$) pendant au moins 30 minutes avant utilisation. Les réactifs doivent être replacés au congélateur dans les 4 heures suivant leur retrait.

Les réactifs du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit sont dilués de façon optimale et ne nécessitent aucune purification ni aucun traitement supplémentaire avant leur utilisation pour l'analyse, comme indiqué dans les *Instructions d'utilisation du kit ipsogen IDH1 RGQ PCR* (ce document).

Remarque : il convient de prêter attention aux dates de péremption et aux conditions de conservation imprimées sur la boîte et les étiquettes de tous les composants. N'utilisez pas de composants périmés ou mal stockés.

8.1.1. Stabilité à l'utilisation

Ne pas utiliser si elles ont été stockées en dehors des spécifications, si l'emballage a été endommagé ou si d'autres signes de détérioration ou de dysfonctionnement sont visibles.

Une fois ouverts, les réactifs peuvent être conservés dans leur emballage d'origine entre -30°C et -15°C pendant 90 jours, ou jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage, selon la première échéance.

8.2. Stockage et manipulation des échantillons

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit est destiné à être utilisé avec des échantillons de sang total (ST) ou d'aspirat de moelle osseuse (BMA) humains, frais ou congelés, recueillis dans des tubes K2-EDTA.

Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement dangereux. Jetez les échantillons et les dosages usagés conformément aux procédures de sécurité locales.

8.2.1. Prélèvement et conservation des échantillons

Les échantillons de sang total et d'aspirat de moelle osseuse doivent être prélevés dans des tubes K2-EDTA conformément aux recommandations du fabricant. Les échantillons doivent être transportés conformément à la norme ISO 20658:2023 et doivent respecter les conditions de conservation (y compris le nombre maximal de cycles de congélation-décongélation) décrites ci-dessous dans cette section afin de garantir la qualité des échantillons. L'ADN peut être conservé après l'extraction, avant l'analyse.

Les conditions de conservation recommandées pour les échantillons sont décrites ci-dessous :

- En cas de réfrigération, jusqu'à 7 jours entre 2° C et 8 °C.
- En cas de congélation, jusqu'à 3 semaines pour le sang total (ST) et jusqu'à 9 semaines pour les échantillons de ponction-biopsie de moelle osseuse (BMA) à -30 °C à -15 °C. Ne pas dépasser un maximum de deux cycles de congélation-décongélation pour les échantillons de ST ou de BMA.

Les conditions de conservation recommandées pour l'ADNg sont décrites ci-dessous :

- En cas de réfrigération, jusqu'à 2 semaines entre 2 °C et 8 °C.
- En cas de congélation, jusqu'à 9 semaines entre -30 °C et -15 °C.

8.2.2. Substances interférentes dans les échantillons

Les substances présentes dans les échantillons de sang total ou d'aspirat de moelle osseuse pourraient avoir un impact sur les performances du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

L'impact des substances interférentes potentielles a été évalué ; reportez-vous à la section « Caractéristiques de performances » pour plus de détails et pour obtenir la liste des substances testées. Une interférence a été observée avec les agents suivants : cytarabine, décitabine, étoposide, chlorhydrate d'idarubicine, chlorhydrate de daunorubicine, azacitidine et triglycérides.

9. Protocole : Préparation des échantillons

Points importants avant de commencer

- Lire « Avertissements et précautions ».
- S'assurer que tout le matériel requis mais non fourni est disponible (voir page "Matériel nécessaire, mais non fourni" à la page 16).
- S'assurer que tous les réactifs et consommables sont stockés correctement et que leur date de péremption n'est pas dépassée.
- S'assurer que tout l'équipement a été vérifié et étalonné conformément aux recommandations du fabricant.

Purification de l'ADN

La purification de l'ADN doit être effectuée conformément aux instructions du protocole d'extraction manuelle par microcentrifugation figurant dans le *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook*.

Remarque : utiliser 200 µL de sang total ou d'aspirat de moelle osseuse pour l'extraction. S'assurer que les échantillons sont bien mélangés (par ex. par inversion) avant l'extraction.

Remarque : l'ADN doit être élué avec 200 µL de tampon d'élution (AE).

Remarque : le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit a été développé pour être utilisé avec le kit QIAamp DSP DNA Blood Mini avec le protocole d'extraction manuelle par microcentrifugation. Pour garantir des performances optimales, l'utilisation d'autres produits d'extraction, protocoles et/ou systèmes automatisés n'est pas autorisée.

Quantification et normalisation de l'ADN

L'ADNg extrait d'échantillons de sang total ou d'aspirats de moelle osseuse doit être quantifié (par exemple, à l'aide d'un instrument de quantification spectrophotométrique) conformément aux procédures locales.

Remarque : assurez-vous d'utiliser le tampon d'élution approprié pour étalonner l'instrument de quantification.

- Si la concentration mesurée est comprise entre 1 et 6 ng/μL (bornes incluses), la normalisation de l'échantillon n'est pas nécessaire.
- Si la concentration mesurée est inférieure à 1 ng/μL, l'échantillon doit faire l'objet d'une nouvelle extraction.
- Si la concentration mesurée est supérieure à 6 ng/μL, l'échantillon doit être dilué à 5 ng/μL avec l'eau pour dilution (Dil.) fournie dans le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit, selon la formule :

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Où

- C_i : concentration initiale de l'ADNg extrait
- C_f : concentration finale visée = 5 ng/μL
- V_f : volume final nécessaire pour effectuer une série de tests *ipsogen* IDH1 RGQ PCR (c.-à-d. 10 μL + volume supplémentaire pour erreur de pipetage)
- V_i : volume initial d'ADNg extrait à pipeter et à diluer avec l'eau de dilution (Dil.) fournie dans le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit

Note : volume d'eau à ajouter à l'ADNg extrait = $V_f - V_i$

Note : utilisez le tube d'eau de dilution (Dil.) fourni pour diluer l'échantillon, si nécessaire.

Exemple concret

- Par exemple, si la concentration d'ADNg mesurée est de 20 ng/μL, le volume d'eau à ajouter à l'ADNg peut être déterminé comme suit :
 - $C_i = 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ [ou selon la mesure]
 - $C_f = 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ [valeur fixe]
 - $V_f = 15 \mu\text{L}$ [volume suffisant avec un surplus pour les réactions de PCR]
 - V_i est calculé comme suit :

$$20 \text{ ng}/\mu\text{L} \times V_i = 5 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 15 \mu\text{L}$$

$$V_i = \frac{5 \times 15}{20} = 3,75 \mu\text{L}$$

- Le volume d'eau à ajouter est calculé comme suit :

$$\text{Volume d'eau à ajouter} = V_f - V_i = 15 - 3,75 = 11,25 \mu\text{L}$$

Distribuer 11,25 μL d'eau de dilution dans un tube approprié. Ajouter 3,75 μL d'échantillon d'ADNg, puis mélanger soigneusement.

10. Protocole : détection des mutations IDH1

Points importants avant de commencer

- Lisez « Avertissements et précautions ».
- S'assurer que tout le matériel requis mais non fourni est disponible (voir page "Matériel nécessaire, mais non fourni" à la page 16).
- S'assurer que tous les réactifs et consommables sont stockés correctement et que leur date de péremption n'est pas dépassée.
- Avant de commencer le protocole, familiarisez-vous avec l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Consultez les manuels d'utilisation de l'instrument, du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 et de Gamma Plug-in pour plus de détails.
- Assurez-vous que tout l'équipement a été vérifié et étalonné conformément aux recommandations du fabricant.
- N'agitez pas l'ADN polymérase Taq (Taq) au vortex, car cela pourrait inactiver l'enzyme.
- Pipetez l'ADN polymérase Taq (Taq) en plaçant l'embout de la pipette juste sous la surface du liquide afin d'éviter que l'embout ne soit recouvert d'un excès d'enzyme.
- Avant de commencer, les paramètres suivants doivent être configurés à partir de l'onglet Configuration (Figure 2 et Figure 3).

Finish run

☐ Run has to be released before starting approval
☐ Release of run has to be signed

Figure 2. Assurez-vous que les cases « Run has to be released before starting approval » et « Release of run has to be signed » ne sont pas cochées.

Work list

Format of generated work list names
 WL_20110513_0430

User-definable section
 WL

☒ Date
☒ Time
☐ Operator

☒ Enable processing of unclear samples
☒ Enable checksum for LIMS import

Closed mode	UDT mode
☐ Material number required	☐ Material number required
☒ Valid expiry date required	☐ Valid expiry date required
☒ Lot number required	☐ Lot number required

Figure 3. Assurez-vous que la case « Material number required » n'est pas cochée.

10.1. Étapes préliminaires

- Avant chaque utilisation, décongelez tous les réactifs, à l'exception de l'ADN polymérase Taq (Taq) et des échantillons, à température ambiante (15–25 °C) pendant au moins 30 minutes. Agitez au vortex pendant 5 à 12 secondes pour mélanger, puis centrifugez brièvement pour recueillir le contenu au fond du tube. Remplacez les mélanges réactionnels IDH1, le PC et le NTC au congélateur (–30 °C à –15 °C) dans les 4 heures suivant le début du processus de décongélation.

Note : ne sortez l'ADN polymérase Taq (Taq) que lorsque les réactifs sont décongelés.

- Assurez-vous que les échantillons à tester sont complètement décongelés et bien mélangés.
- Téléchargez et installez tous les logiciels requis. Pour plus d'informations sur l'installation du logiciel, reportez-vous à la section « Installation of Gamma plug-in and importing the assay profile », page suivante.
 - Logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 (version 2.1.1 ou ultérieure)
(réf. n°. 9024203)

- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in v1.0 (ou version ultérieure) (réf. n°. 9025511)
- Profil d'analyse du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR

10.1.1. Installation de Gamma Plug-in et importation du profil du dosage

Pour plus d'informations sur l'installation du logiciel de base Rotor-Gene AssayManager v2.1, veuillez vous reporter au *Manuel d'utilisation de l'application de base Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx*.

L'installation et l'importation de Gamma Plug-in et du profil de dosage sont détaillées dans le *Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx Core Application User Manual*.

1. Téléchargez le plug-in Gamma sur le site Web de QIAGEN (www.qiagen.com).
2. Lancez le processus d'installation en double-cliquant sur le fichier `RGAM_v2_1_Gamma__Plug-in.Installation.v1_0_x.msi` (où x est ≥ 0) et en suivant les instructions d'installation. Pour obtenir une description détaillée de ce processus, veuillez vous reporter à la section « Installing Plug-ins » du *Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx Core Application User Manual*.
3. Une fois l'installation du plug-in réussie, une personne disposant de droits d'administrateur pour le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 devra importer la dernière version du profil de dosage, comme suit.
 - a. Ouvrez le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 en cliquant sur l'icône ci-dessous.



La fenêtre suivante s'ouvre :

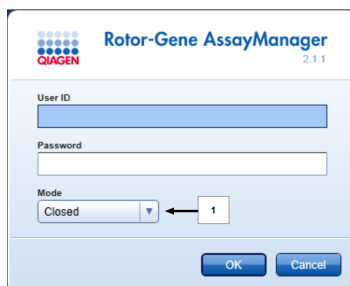


Figure 4. Rotor-Gene AssayManager V2.1.

- b. Connectez-vous au logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 à l'aide de votre identifiant et de votre mot de passe. Ne pas modifier le mode « Closed » (fermé). Cliquez sur **OK**. La fenêtre suivante s'ouvre :

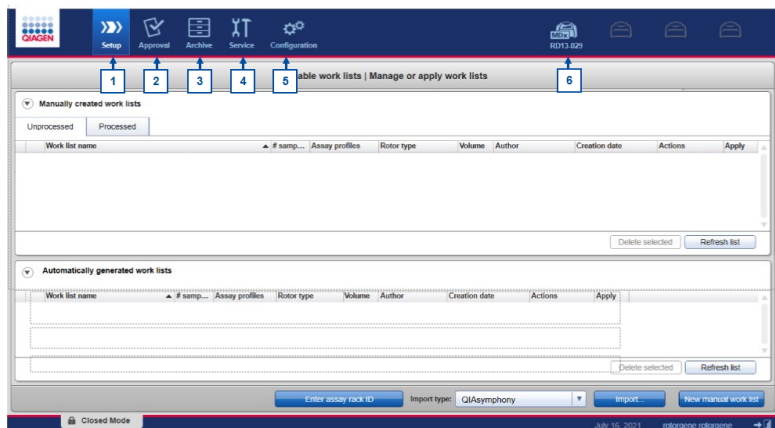


Figure 5. Rotor-Gene AssayManager v2.1.1. 1 : Onglet Setup. Cet onglet vous permet de gérer ou de mettre en œuvre des travaux. **2 : Onglet Approval.** Cet onglet permet de trouver les expériences précédentes. **3 : Onglet Archive.** Cet onglet vous permet de retrouver d'anciennes expériences déjà approuvées. **4 : Onglet Service.** Dans cet onglet, une piste d'audit de chaque fichier généré par le logiciel est répertoriée. **5 : Onglet Configuration.** Cet onglet permet de configurer tous les paramètres du logiciel. **6 : Icône Rotor-Gene Q (RGQ).**



- c. Sélectionner l'environnement de configuration.
- d. Sélectionner l'onglet **Assay Profiles** (profils de dosage).
- e. Cliquer sur **Import** (Importer).
- f. Sélectionner le profil de dosage à importer dans la boîte de dialogue, puis cliquer sur **Open** (Ouvrir).
- g. Une fois le profil de dosage importé avec succès, il peut être utilisé dans l'environnement « Setup ».

Remarque : la même version d'un profil de dosage ne peut pas être importée deux fois.

10.1.2. Procédure

1. Décongeler tous les réactifs, à l'exception de l'ADN polymérase Taq (Taq), à température ambiante (15–25 °C) pendant 30 minutes au minimum et 2 heures au maximum avant utilisation.

Note : ne sortez l'ADN polymérase Taq (Taq) que lorsque les réactifs sont décongelés.

Note : remettre les mélanges réactionnels IDH1, le PC et le NTC au congélateur (–30 °C à –15 °C) dans les 4 heures suivant le début du processus de décongélation.

Note : il est recommandé de remettre les mélanges réactionnels IDH1 et la Taq au congélateur (–30 °C à –15 °C) immédiatement après la préparation des mélanges maîtres.

2. Mélanger tous les réactifs, à l'exception de la Taq, par agitation au vortex pendant 5 à 12 secondes afin d'éviter des concentrations localisées de sels, puis centrifuger brièvement pour recueillir le contenu au fond du tube.

Note : l'ADN polymérase Taq (Taq) ne doit pas être agitée au vortex.

Note : la durée totale entre le début de la préparation de la PCR et le début de l'analyse ne doit pas dépasser 2 heures.

3. Préparer suffisamment de mélanges maîtres (mélanges réactionnels IDH1 plus ADN polymérase Taq [Taq]) pour les échantillons d'ADN, une réaction de contrôle positif et une réaction de témoin négatif (NTC) conformément aux volumes indiqués dans Tableau 3 et Tableau 4.

Note : inclure des réactifs pour $n + 2$ échantillons supplémentaires afin de prévoir un surplus suffisant pour la préparation de la PCR.

Note : le nombre maximal de séries utilisant le nombre optimal d'échantillons pour l'utilisation du kit PCR *ipsogen* IDH1 RGQ est de trois séries de huit échantillons par série.

Note : le mélange maître contient tous les composants nécessaires à la PCR, à l'exception de l'échantillon et des contrôles.

4. Remettre les mélanges réactionnels IDH1 et la Taq au congélateur (−30 °C à −15 °C) immédiatement après avoir préparé les mélanges maîtres.

Tableau 2. Nombre de réactions pour l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM avec 72-Well Rotor

Échantillons	Réaction
Avec le Master Mix IDH1 1	
24 échantillons d'ADNg	24 réactions
Contrôle positif (PC)	1 réaction
Témoin négatif (NTC)	1 réaction
Avec le Master Mix IDH1 2	
24 échantillons d'ADNg	24 réactions
Contrôle positif (PC)	1 réaction
Témoin négatif (NTC)	1 réaction

Tableau 3. Préparation du Master Mix IDH1 1 (MM1)*

Composant	Volume
IDH1 Reaction Mix 1	19,6 µL × (n + 2)*
Taq DNA Polymerase (Taq)	0,4 µL × (n + 2)*
Volume total	20,0 µL/réaction

* n = nombre de réactions (échantillons plus contrôles). Lors de la préparation du mélange maître, en préparer suffisamment pour deux échantillons supplémentaires (n + 2) afin de prévoir un surplus suffisant pour la configuration de la PCR.

Tableau 4. Préparation du mélange maître 2 IDH1 (MM2)*

Composant	Volume
IDH1 Reaction Mix 2	$19,6 \mu\text{L} \times (n + 2)^*$
ADN polymérase Taq (Taq)	$0,4 \mu\text{L} \times (n + 2)^*$
Volume total	20,0 μL /réaction

* n = nombre de réactions (échantillons plus témoins). Lors de la préparation du mélange maître, en préparer suffisamment pour deux échantillons supplémentaires (n + 2) afin de prévoir un surplus suffisant pour la configuration de la PCR.

- 5. Mélanger soigneusement le mélange maître par agitation au vortex pendant 5 à 12 secondes, puis centrifuger brièvement pour recueillir le contenu au fond du tube.
- 6. Placer le nombre approprié de barrettes de tubes PCR de 0,1 mL dans le bloc de chargement conformément au schéma de la Tableau 5.

Remarque : maintenir les tubes PCR dans le bloc de chargement jusqu'à ce que la configuration de la réaction PCR soit terminée. Cela réduit la probabilité d'erreurs lors de la configuration de la PCR.

- 7. Ajouter immédiatement 20 μL de mélange maître dans chaque barrette de tubes de PCR de 0,1 mL (non fournies).

Note : ajouter le MM1 et le MM2 sur des rangées alternées.

Note : ne pas boucher les tubes. Les bouchons resteront dans le récipient en plastique jusqu'à leur utilisation.

- 8. Ajouter immédiatement 5 μL d'eau pour le témoin négatif (NTC) dans les tubes de témoin négatif (tubes de PCR numéros 3 et 4).

Note : s'assurer que le tube d'eau pour le témoin négatif est utilisé pour le NTC. Le tube d'eau pour la dilution d'échantillon ne doit pas être utilisé comme NTC.

- 9. Boucher le tube contenant le NTC (tubes PCR numéros 3 et 4).

Tableau 5. Disposition des tests d'échantillons dans le bloc de chargement (les numéros indiquent les positions dans le bloc de chargement et la position finale du rotor)

Mélange

PC MM1 (1)	Échantillon 3 MM1 (9)	Échantillon 7 MM1 (17)	Échantillon 11 MM1 (25)	Échantillon 15 MM1 (33)	Échantillon 19 MM1 (41)	Échantillon 23 MM1 (49)	–	–
PC MM2 (2)	Échantillon 3 MM2 (10)	Échantillon 7 MM2 (18)	Échantillon 11 MM2 (26)	Échantillon 15 MM2 (34)	Échantillon 19 MM2 (42)	Échantillon 23 MM2 (50)	–	–
NTC MM1 (3)	Échantillon 4 MM1 (11)	Échantillon 8 MM1 (19)	Échantillon 12 MM1 (27)	Échantillon 16 MM1 (35)	Échantillon 20 MM1 (43)	Échantillon 24 MM1 (51)	–	–
NTC MM2 (4)	Échantillon 4 MM2 (12)	Échantillon 8 MM2 (20)	Échantillon 12 MM2 (28)	Échantillon 16 MM2 (36)	Échantillon 20 MM2 (44)	Échantillon 24 MM2 (52)	–	–
Échantillon 1 MM1 (5)	Échantillon 5 MM1 (13)	Échantillon 9 MM1 (21)	Échantillon 13 MM1 (29)	Échantillon 17 MM1 (37)	Échantillon 21 MM1 (45)	–	–	–
Échantillon 1 MM2 (6)	Échantillon 5 MM2 (14)	Échantillon 9 MM2 (22)	Échantillon 13 MM2 (30)	Échantillon 17 MM2 (38)	Échantillon 21 MM2 (46)	–	–	–
Échantillon 2 MM1 (7)	Échantillon 6 MM1 (15)	Échantillon 10 MM1 (23)	Échantillon 14 MM1 (31)	Échantillon 18 MM1 (39)	Échantillon 22 MM1 (47)	–	–	–
Échantillon 2 MM2 (8)	Échantillon 6 MM2 (16)	Échantillon 10 MM2 (24)	Échantillon 14 MM2 (32)	Échantillon 18 MM2 (40)	Échantillon 22 MM2 (48)	–	–	–

10. Ajouter 5 µL de chaque échantillon aux tubes d'échantillon (par exemple, tubes PCR numéros 5–52).
11. Boucher les tubes contenant les échantillons.

12. Ajouter 5 µL de contrôle positif (PC) IDH1 dans les tubes de contrôle positif (tubes PCR numéros 1 et 2).
13. Boucher les tubes contenant le PC.
14. À l'aide d'un marqueur permanent, marquer les couvercles des tubes pour indiquer le sens de chargement des tubes dans l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
15. Une fois tous les tubes de PCR bouchés, vérifier visuellement les niveaux de remplissage des tubes d'échantillon pour s'assurer qu'un échantillon a été ajouté dans tous les tubes.
16. Placer les barrettes de tubes de PCR dans les positions appropriées du 72-Well Rotor (Tableau 5). Si le rotor n'est pas complètement rempli, toutes les positions vides du rotor doivent être occupées par un tube vide bouché.
17. Placer immédiatement le 72-Well Rotor dans l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. S'assurer que la bague de verrouillage (accessoire de l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) est placée sur le rotor pour maintenir les tubes pendant l'analyse.

Lancement d'une série d'analyses de mutation d'IDH1

1. Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit doit être utilisé sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 et Gamma Plug-in doivent être installés avant utilisation.
2. Le logiciel principal Rotor-Gene AssayManager v2.1 et Gamma Plug-in disposent chacun d'un manuel d'utilisation distinct. Pour les instructions d'installation, reportez-vous aux sections « Installation de Rotor-Gene AssayManager v2.1 » et « Installation des plug-ins » du *Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx Core Application User Manual*.
3. Le profil d'analyse *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit doit être importé dans le logiciel Rotor-Gene AssayManager avant utilisation. Pour les instructions, voir la section « Installation de Gamma Plug-in et importation du profil d'analyse » à la page "Installation de Gamma Plug-in et importation du profil du dosage" à la page 30. Le profil d'analyse contient tous les paramètres nécessaires à l'exécution d'une série de PCR, à l'analyse automatique et à

l'interprétation des résultats.

4. Un lecteur PDF doit être installé pour consulter les rapports d'analyse générés par Rotor-Gene AssayManager.

Les instructions suivantes détaillent la configuration d'une série d'analyses de mutations IDH1 à l'aide du logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1. Pour des instructions détaillées, reportez-vous aux manuels d'utilisation respectifs.

5. Ouvrez le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 en double-cliquant sur l'icône du bureau (Figure 6).



Figure 6. Icône de bureau Rotor-Gene AssayManager.

6. Sur l'écran de connexion de Rotor-Gene AssayManager (Figure 7), saisissez l'identifiant utilisateur et le mot de passe, sélectionnez le mode **Closed** et cliquez sur **OK**. La fenêtre principale de Rotor-Gene AssayManager s'ouvre alors.

The login window for Rotor-Gene AssayManager v2.1.1.1. It has a light blue header with the QIAGEN logo and the text "Rotor-Gene AssayManager 2.1.1.1". Below the header, there are three input fields: "User ID", "Password", and "Mode". The "Mode" field is a dropdown menu currently showing "Closed". At the bottom right, there are two buttons: "OK" and "Cancel".

Figure 7. Écran de connexion au logiciel Rotor-Gene AssayManager.

7. Sélectionnez **New manual work list** (nouvelle liste de travail manuel) dans la fenêtre principale pour créer une nouvelle liste de travail (Figure 8, indiquée par l'encadré 1).

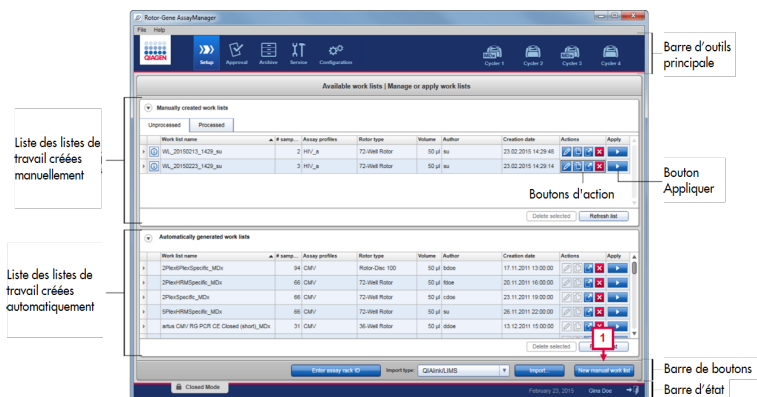


Figure 8. Fenêtre principale de Rotor-Gene AssayManager. L'encadré 1 indique le bouton **New manual work list**.

8. Pour effectuer une analyse IDH1, assurez-vous que l'onglet **Assays** (Analyses) est sélectionné. Cliquez sur le profil d'analyse **ipsogen_IDH1_Blood_BMA** dans la fenêtre « Available assay profiles » (Profils d'analyse disponibles) (Figure 9, indiqué par l'encadré 1) et cliquez sur la **flèche bleue** pour sélectionner le profil d'analyse (Figure 9, indiqué par l'encadré 2). Si nécessaire, placez le pointeur de la souris sur le profil d'analyse pour afficher son nom complet. Le profil d'analyse doit maintenant apparaître dans la fenêtre « Selected assay profiles » (Profils d'analyse sélectionnés) (Figure 9).

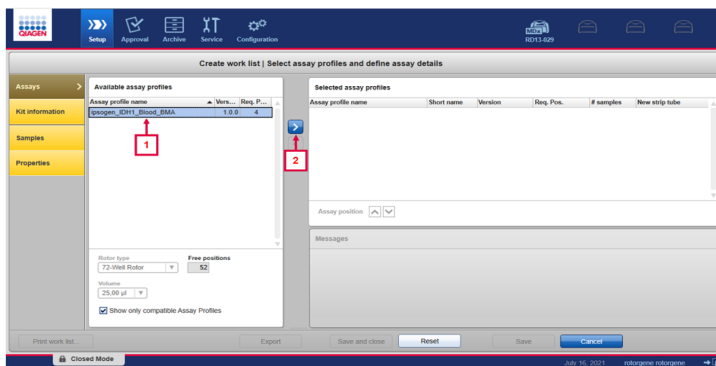


Figure 9. Fenêtre « Create work list » (Créer une liste de travail). L’encadré 1 indique le profil d’essai à sélectionner. L’encadré 2 indique comment sélectionner le profil d’essai choisi.

9. Dans la fenêtre « Selected assay profiles » (Figure 10, indiquée par l’encadré 1), saisissez le nombre d’échantillons à tester (à l’exclusion des témoins). Cliquez ensuite sur l’onglet **Samples** (Échantillons) pour saisir les « informations sur l’échantillon » (Figure 10, indiquées par l’encadré 2).

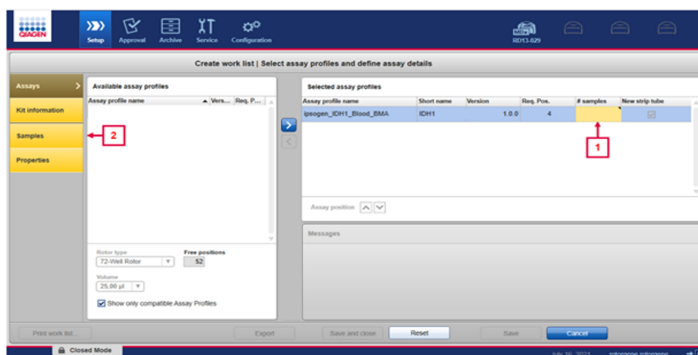


Figure 10. Fenêtre « Create work list » dans l’onglet « Assays ». L’encadré 1 indique l’emplacement où ajouter le nombre d’échantillons. L’encadré 2 indique l’onglet « Samples »

10. Saisissez les noms des échantillons dans la colonne « Sample ID » (ID d'échantillon) (Figure 11, indiquée par l'encadré 1). Saisissez les éventuels commentaires dans la colonne « Comments » (Commentaires). Cliquez ensuite sur l'onglet **Propriétés** (Propriétés) (Figure 11, indiquée par l'encadré 2).

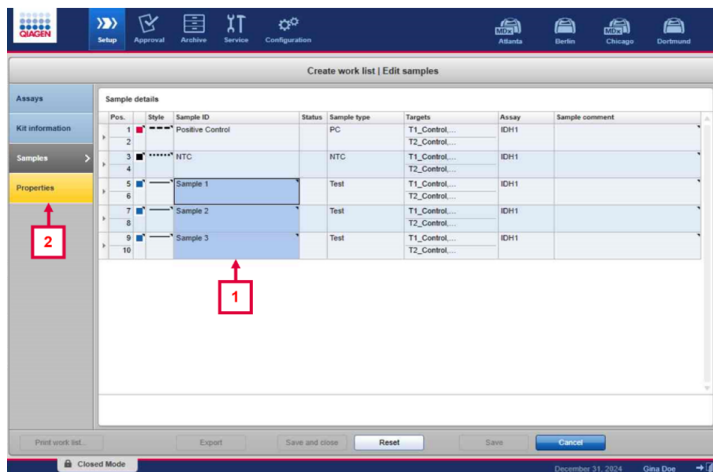


Figure 11. Fenêtre « Create work list » de l'onglet « Samples ». L'encadré 1 indique la colonne ID d'échantillon. L'encadré 2 indique l'onglet Properties.

11. Saisissez un nom de liste de travail dans la zone de texte « Work list name » (Nom de la liste de travail) et cochez la case « work list is complete » (la liste de travail est complète) (peut être appliquée) (Figure 12, indiquée par l'encadré 1 et l'encadré 2). Cliquez sur **Apply** (Appliquer) pour appliquer la liste de travail (Figure 12, indiquée par l'encadré 3).

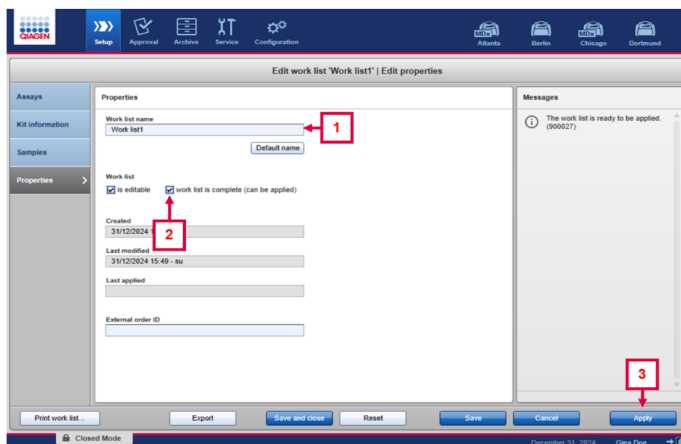


Figure 12. Fenêtre « Create work list » de l'onglet « Properties ». L'encadré 1 indique l'endroit où saisir le nom de la liste de travail. L'encadré 2 indique la case à cocher « worklist complete ». L'encadré 3 indique le bouton Apply.

12. Saisir un nom d'expérience dans la zone de texte « Experiment name » (Nom de l'expérience) (Figure 13, indiqué par l'encadré 1). S'assurer que le bon cycleur a été sélectionné et que la case à cocher « Ring attached » (Anneau fixé) a été cochée (Figure 13, indiqué par les encadrés 2 et 3). Cliquer sur **Start run** (Démarrer l'analyse) pour continuer (Figure 13, indiqué par l'encadré 4).

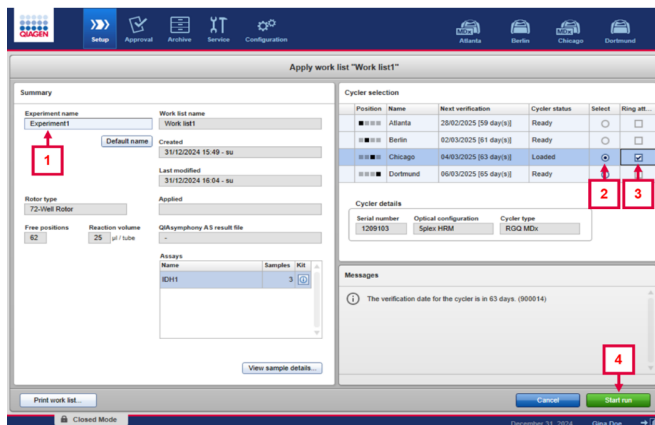


Figure 13. Fenêtre « Apply work list ». L'encadré 1 indique l'emplacement où saisir le nom de l'analyse. Les encadrés 2 et 3 indiquent l'emplacement où sélectionner le thermocycleur approprié et confirmer que l'anneau a été fixé. L'encadré 4 indique le bouton **Start run**.

13. Une fois l'analyse terminée, cliquez sur **Finish run** (Terminer l'analyse) pour valider et approuver l'analyse (Figure 14, indiqué par l'encadré 1).

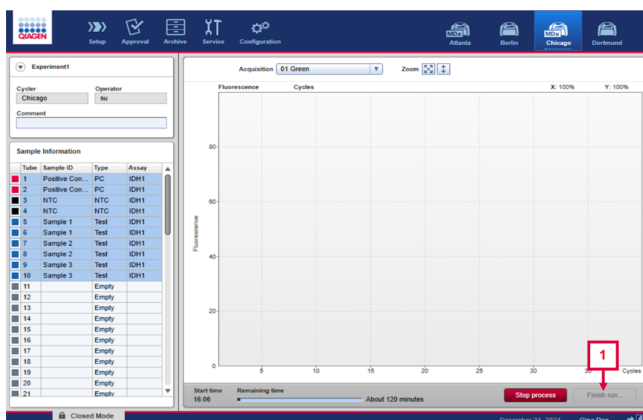


Figure 14. Exemple de fenêtre « Cycler Environment ». L'encadré 1 présente le bouton **Finish run**.

14. Pour consulter les informations relatives à la série et les résultats de l'analyse IDH1, cliquez sur **Release and go to approval** (Valider et soumettre à l'approbation) (Figure 15). Cette opération libère également l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, qui est alors prêt pour la série suivante.

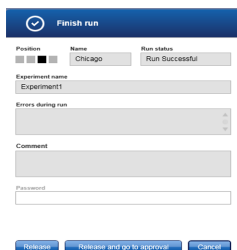


Figure 15. Boîte de dialogue « Finish Run ».

15. Le profil d'analyse `ipsogen_IDH1_Blood_BMA` contient toutes les règles relatives à l'analyse automatique des tests et des échantillons, ainsi qu'à l'interprétation des résultats. Le logiciel va par conséquent automatiquement évaluer la validité ou la non-validité des échantillons et contrôles.

Note : pour plus d'informations sur l'interprétation des résultats d'analyse, reportez-vous à la section « Interprétation des résultats ».

16. Les données traitées, les informations sur l'expérience, l'analyse et les informations sur la piste d'audit se trouvent dans la fenêtre « Plots and information » (Tracés et informations). Les résultats d'analyse se trouvent dans la fenêtre « Assay Results » (Résultats d'analyse). Si les résultats du contrôle positif et du témoin négatif (NTC) se situent dans une plage acceptable, la colonne « Overall sample result » (Résultat global de l'échantillon) indiquera « valid » (valide) (Figure 16) ; sinon, un résultat « INVALID » (INVALIDE) s'affichera (Figure 17).

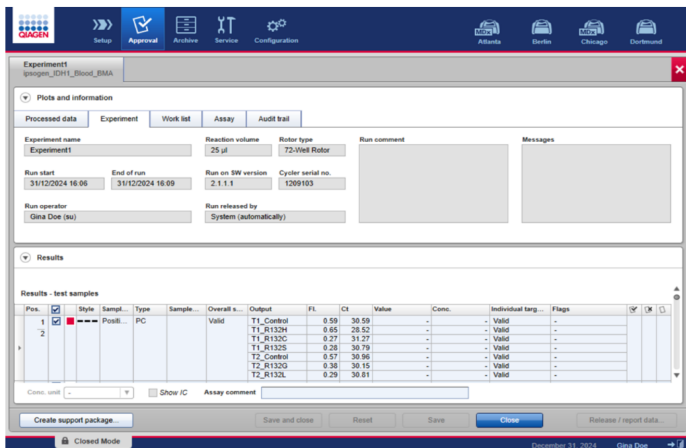


Figure 16. Fenêtre « Assay Results » valide.

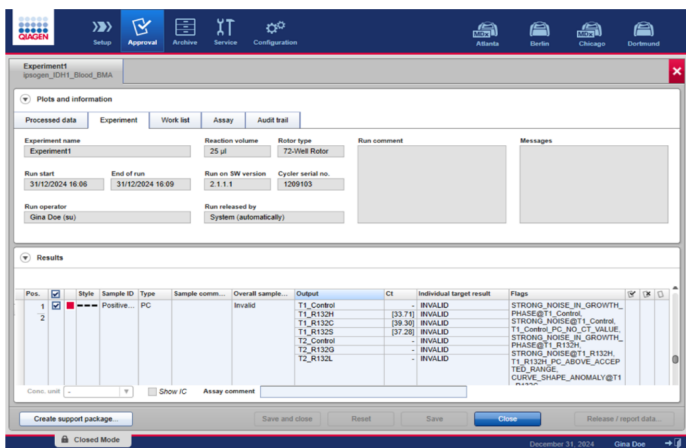


Figure 17. Fenêtre « Assay Results » non valide.

17. Si les résultats du contrôle de l'échantillon se situent dans une plage acceptable, la colonne « Overall sample result » indiquera soit « No Mutation Detected » (Aucune mutation détectée), soit « IDH1 Mutation Detected » (Mutation IDH1 détectée) (Figure 18). Cela indique que la concentration d'ADN de l'échantillon est adaptée à l'analyse des mutations.

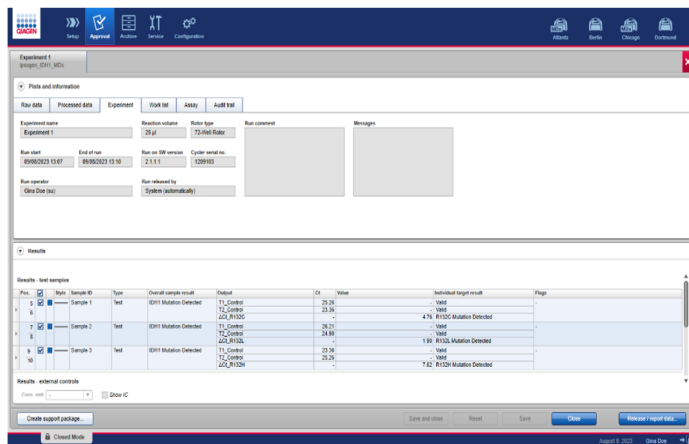


Figure 18. Fenêtre des résultats de l'échantillon.

18. Cliquer sur **OK** pour enregistrer l'analyse dans l'archive et créer une sortie LIMS ainsi qu'un rapport d'analyse (Figure 19). Les rapports de cycles d'exécution et les exportations vers le LIMS sont enregistrés dans le répertoire des rapports par défaut. Le répertoire par défaut se trouve dans les répertoires d'exportation des données de l'onglet « Configuration ».

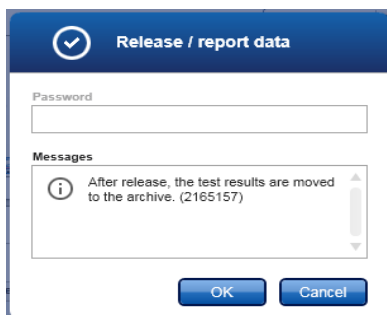


Figure 19. Boîte de dialogue « Release/report data ».

19. La boîte de dialogue « Status of release » (État de la validation) s’affiche. Cliquez sur **OK** pour valider (Figure 20).

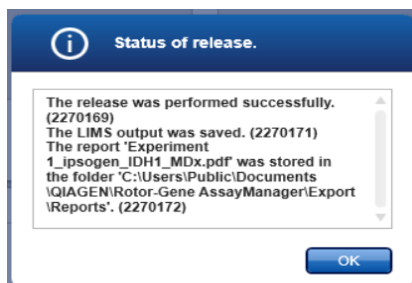


Figure 20. Boîte de dialogue « Status of release ».

20. Les expériences validées peuvent désormais être récupérées dans l’environnement « Archive ». Pour trouver une expérience, cliquez sur l’onglet **Archive** et saisissez les critères de recherche nécessaires.

11. Interprétation des résultats

L'analyse et les appels de mutation sont effectués automatiquement par le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 en utilisant le profil d'essai *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit une fois qu'une série est terminée, et ne nécessitent aucune interprétation manuelle.

Les informations suivantes expliquent comment l'analyse et les appels de mutation sont effectués.

Analyse et détection des mutations

Le cycle de PCR auquel la fluorescence d'une réaction particulière franchit la valeur seuil prédéfinie donnée par le profil d'essai *ipsogen*_IDH1_Blood_BMA est défini comme la valeur Ct. Les valeurs Ct indiquent la quantité d'ADN initial spécifique. Des valeurs Ct faibles indiquent des niveaux d'ADN initial plus élevés et des valeurs Ct élevées indiquent des niveaux d'ADN initial plus faibles. Pour chaque essai de mutation IDH1, un calcul est effectué pour déterminer la valeur ΔCt à l'aide de l'équation:

$$\Delta Ct = [\text{mutation assay Ct value}] - [\text{control assay Ct value}]$$

Sur la base des valeurs de Ct et ΔCt analytiques prédéterminées, le profil d'essai *ipsogen*_IDH1_Blood_BMA détermine qualitativement le statut mutationnel des échantillons d'ADN et indique si un échantillon contient une ou plusieurs des mutations IDH1 spécifiées.

Les contrôles (PC, NTC, contrôle de l'échantillon) sont évalués pour s'assurer que les valeurs de Ct acceptables sont atteintes et que les réactions ont été effectuées avec succès.

Si les valeurs de Ct se situent en dehors de la plage acceptable, un résultat « INVALID » est obtenu et un ou plusieurs indicateurs sont signalés. Pour plus d'informations, consultez « *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile Flags », page suivante. Par exemple, si le Ct du

contrôle de l'échantillon est inférieur à la plage acceptable, cela signifie que la quantité d'ADN introduite est trop élevée et que l'échantillon doit être dilué.

Remarque : le statut mutationnel IDH1 n'est pas signalé en cas d'échantillon non valide ou de série non valide.

Le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 détermine le résultat de chaque cible en combinant tous les résultats d'analyse pertinents selon des algorithmes d'analyse de base, tels que la normalisation et les règles relatives aux échantillons et aux tests définies dans le profil de test correspondant.

Les résultats suivants peuvent être attribués à un échantillon individuel :

- IDH1 Mutation Detected (Mutation IDH1 détectée)
- Pas de mutation détectée
- INVALID (NON VALIDE) : si un ou plusieurs marqueurs (flags) sont attribués à l'échantillon au cours de l'analyse par le logiciel Rotor-Gene AssayManager v2.1 et que ceux-ci sont configurés pour définir le résultat de la cible sur « INVALID ».

Note : si une erreur est survenue lors du cycle, les échantillons présents dans l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM doivent être éliminés et ne doivent pas être analysés à nouveau.

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile Flags

Les indicateurs correspondant à Gamma Plug-in de Rotor-Gene AssayManager v2.1 qui ne sont pas spécifiques à ce *ipsogen_IDH1_Blood_BMA* profil d'analyse uniquement sont répertoriés dans Tableau 6.

Tableau 6. Indicateurs relatifs à Gamma Plug-in de Rotor-Gene AssayManager v2.1

Indicateur	Description	Action
ANALYSIS_FAILED	Le dosage apparaît comme invalide, car l'analyse a échoué.	Veuillez contacter l'assistance technique de QIAGEN.
ASSAY_INVALID	L'échantillon n'est pas valide car au moins un contrôle externe n'est pas valide.	Recommencez le cycle. Consultez Tableau 7.
CONSECUTIVE_FAULT	Une cible utilisée pour le calcul de cette cible n'est pas valide.	Aucune action supplémentaire n'est requise
CURVE_SHAPE_ANOMALY	La courbe d'amplification des données brutes dévie par rapport au comportement établi pour ce dosage. La probabilité de résultats incorrects ou d'une mauvaise interprétation est très élevée.	Renouvelez le test. Contactez le support technique de QIAGEN si cet indicateur apparaît lors du renouvellement du test.
FLAT_BUMP	La courbe d'amplification présente une bosse plate qui s'écarte du comportement établi pour ce dosage. Il existe une forte probabilité de résultats incorrects ou d'une mauvaise interprétation des résultats (p. ex. détermination d'une valeur Ct erronée).	Renouvelez le test. Contactez le support technique de QIAGEN si cet indicateur apparaît lors du renouvellement du test.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	La courbe d'amplification franchit la valeur seuil plusieurs fois. Une valeur Ct non ambiguë ne peut pas être déterminée.	Renouvelez le test. Contactez le support technique de QIAGEN si cet indicateur apparaît lors du renouvellement du test.
NO_BASELINE	Aucune ligne de base n'a été trouvée. L'analyse suivante ne peut pas être effectuée.	Renouvelez le test. Contactez le support technique de QIAGEN si cet indicateur apparaît lors du renouvellement du test.
OTHER_TARGET_INVALID	Une autre cible du même échantillon est non valide.	Aucune action supplémentaire n'est requise

Indicateur	Description	Action
RUN_FAILED	Le dosage non valide est défini comme non valide en raison d'un problème avec le cycleur ou la connexion du cycleur.	Renouvelez le test. Contactez le support technique de QIAGEN si cet indicateur apparaît lors du renouvellement du test.
RUN_STOPPED	Le dosage non valide est défini comme non valide car le cycle a été arrêté manuellement.	Recommencez le cycle.
SATURATION	La fluorescence des données brutes présente une forte saturation avant le point d'inflexion de la courbe d'amplification.	Renouvelez le test. Veuillez contacter le support technique de QIAGEN si cet indicateur apparaît lors du renouvellement du test.
SPIKE	Un pic de fluorescence est détecté dans les données brutes de la courbe d'amplification, mais en dehors de la zone de détermination du Ct (cycle threshold, seuil de cycle).	Renouvelez le test. Veuillez contacter le support technique de QIAGEN si cet indicateur apparaît lors du renouvellement du test.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Un pic est détecté dans la courbe d'amplification à proximité du seuil de cycle (Ct).	Renouvelez le test. Contactez le support technique de QIAGEN si cet indicateur apparaît lors du renouvellement du test.
STEEP_BASELINE	Une augmentation brutale de la ligne de base dans la fluorescence des données brutes est détectée dans la courbe d'amplification.	Renouvelez le test. Contactez le support technique de QIAGEN si cet indicateur apparaît lors du renouvellement du test.
STRONG_BASELINE_DIP	Une chute brutale de la ligne de base de la fluorescence des données brutes est détectée dans la courbe d'amplification.	Renouvelez le test. Contactez le support technique de QIAGEN si cet indicateur apparaît lors du renouvellement du test.
STRONG_NOISE	Détection d'un bruit de fond élevé en dehors de la phase de croissance de la courbe d'amplification.	Renouvelez le test. Contactez le support technique de QIAGEN si cet indicateur apparaît lors du renouvellement du test.

Indicateur	Description	Action
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Détection d'un bruit de fond élevé dans la phase de croissance (exponentielle) de la courbe d'amplification.	Renouvelez le test. Contactez le support technique de QIAGEN si cet indicateur apparaît lors du renouvellement du test.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Une ondulation de ligne de base dans la fluorescence des données brutes est détectée dans la courbe d'amplification.	Renouvelez le test. Contactez le support technique de QIAGEN si cet indicateur apparaît lors du renouvellement du test.

Tableau 7 et Tableau 8 répertorient les indicateurs pouvant être générés par le profil d'analyse `ipsogen_IDH1_Blood_BMA`, ainsi que leur signification et les mesures à prendre.

Les noms de messages sont formés de façon à fournir des informations sur le composant attribué du kit, l'échantillon ou le contrôle attribué et le mode d'échec.

Par exemple :

`T1_Control_PC_NO_CT_VALUE` = Le contrôle positif (PC), l'essai de contrôle pour le tube 1 n'a pas de valeur Ct

Consultez également la section « Guide de résolution de problèmes ».

Tableau 7. Indicateurs logiciels utilisés par le *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile pour le PC et le NTC

Indicateur	Signification	Action
T1_<target>_PC_NO_CT_VALUE ou T2_<target>_PC_NO_CT_VALUE	Cycle d'exécution non valide. Aucune valeur Ct pour le PC.	Recommencez le cycle.
T1_<target>_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE ou T2_<target>_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Cycle d'exécution non valide. PC au-dessus de la plage de spécification.	Recommencez le cycle.

Indicateur	Signification	Action
T1_<target>_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE ou T2_<target>_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	Cycle d'exécution non valide. PC en dessous de la plage de spécification.	Recommencez le cycle.
T1_<target>_ NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE ou T2_<target>_NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE	Cycle d'exécution non valide. Une valeur Ct a été détectée dans le NTC.	Recommencez le cycle.

Tableau 8. Indicateurs logiciels utilisés par le *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile pour les échantillons

Indicateur	Signification	Action
T1_Control_DNA_INPUT_TOO_HIGH ou T2_Control_DNA_INPUT_TOO_HIGH	Échantillon non valide. Valeur Ct du contrôle de l'échantillon inférieure à la plage de travail du contrôle.	Répétez la quantification et la normalisation de l'ADN. Après un nouveau test, si la valeur Ct de contrôle est toujours non valide, procédez à une nouvelle extraction de l'échantillon. Si la valeur Ct de contrôle n'est pas valide après une nouvelle extraction et deux séries de tests supplémentaires, l'échantillon doit être signalé comme ayant un statut de mutation indéterminé.
T1_Control_ABOVE_ACCEPTED_RANGE ou T2_Control_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Échantillon non valide. Valeur Ct du contrôle de l'échantillon supérieure à la plage de travail du contrôle.	Répétez la quantification et la normalisation de l'ADN. Après un nouveau test, si la valeur Ct de contrôle est toujours non valide, procédez à une nouvelle extraction de l'échantillon. Si la valeur Ct de contrôle n'est pas valide après une nouvelle extraction et deux séries de tests supplémentaires, l'échantillon doit être signalé comme ayant un statut de mutation indéterminé.

Indicateur	Signification	Action
T1_Control_NO_CT_VALUE ou T2_Control_NO_CT_VALUE	Échantillon non valide. Aucune valeur Ct dans l'échantillon.	Répétez la quantification et la normalisation de l'ADN. Après un nouveau test, si la valeur Ct de contrôle est toujours non valide, procédez à une nouvelle extraction de l'échantillon. Si la valeur Ct de contrôle n'est pas valide après une nouvelle extraction et deux séries de tests supplémentaires, l'échantillon doit être signalé comme ayant un statut de mutation indéterminé.

Remarque : si un échantillon retesté est non valide pour une raison différente lors de la répétition, il est toujours considéré comme une deuxième répétition et une réextraction de l'échantillon doit être effectuée. Reportez-vous à Figure 21 pour les procédures de retest et de réextraction.

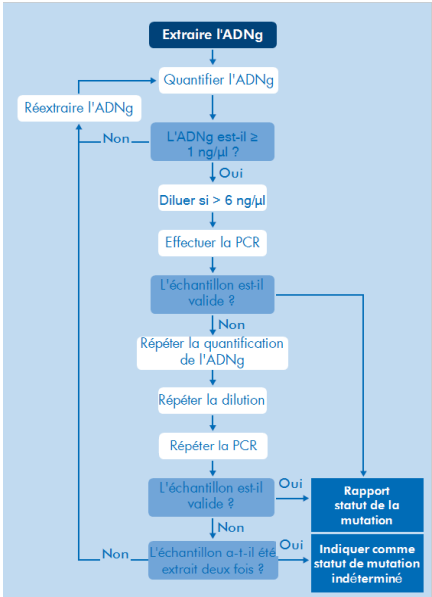


Figure 21. Schéma de la procédure de retest de l'échantillon.

12. Limitations

Le test n'est pas destiné à être utilisé comme dispositif de diagnostic compagnon pour aider les cliniciens à identifier les patients atteints d'un cholangiocarcinome localement avancé ou métastatique qui pourraient être éligibles à un traitement par TIBSOVO sur la base de la détection d'une mutation IDH1.

La détection des mutations dépend de l'intégrité des échantillons et de la quantité d'ADN amplifiable présente dans le prélèvement.

Le test est conçu pour détecter cinq mutations au sein du codon 132 du gène IDH1. Les échantillons dont les résultats sont signalés comme « No Mutation Detected » peuvent contenir des mutations IDH1 non détectées par le test.

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit utilise une procédure de réaction en chaîne par polymérase (PCR). Comme pour toutes les procédures de PCR, les échantillons peuvent être contaminés par des sources d'ADN externes dans l'environnement des tests et par l'ADN du contrôle positif. Faites attention à ne pas contaminer les échantillons et les réactifs du mélange réactionnel.

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit est exclusivement destiné à être utilisé avec des échantillons de sang total et d'aspirat de moelle osseuse prélevés dans des tubes K2-EDTA.

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit est exclusivement destiné à être utilisé avec le kit QIAamp DSP DNA Blood Mini.

Le respect strict du *manuel du kit ipsogen IDH1 RGQ PCR* est impératif pour obtenir des résultats optimaux. La dilution des réactifs, autrement que de la manière décrite dans ce manuel, n'est pas recommandée et entraînera une baisse de performance.

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ne doit être utilisé que si tous les composants de réaction d'un même lot de kit sont utilisés ensemble.

Le produit est exclusivement destiné à être utilisé sur l'instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM .

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit est un test qualitatif. Le test n'est pas destiné aux mesures quantitatives de la mutation en pourcentage.

Les performances du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ne sont pas connues en cas d'introduction d'une contamination microbienne pendant les procédures d'analyse.

Les performances du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit pourraient être affectées par la présence de cytarabine, de décitabine, de triglycérides, d'étoposide, de chlorhydrate d'idarubicine, de chlorhydrate de daunorubicine ou d'azacitidine dans les échantillons analysés.

13. Caractéristiques de performances

13.1. Performances analytiques

13.1.1. Limite du blanc (LoB)

La limite du blanc (Limit of Blank, LoB) est définie dans la consigne du CLSI EP17-A2 comme étant « le résultat de mesure le plus élevé susceptible d’être observé (assorti d’une probabilité donnée) pour un échantillon à blanc ». Pour le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit, il s’agit du point de données qui correspond au 95e centile supérieur dans les échantillons à blanc (type sauvage, c’est-à-dire négatifs pour la mutation R132).

La LoB a été déterminée en mesurant les niveaux de signal parasite pour chacun des cinq tests de mutation IDH1 du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit, le signal parasite étant défini comme l’amplification non spécifique de faible niveau d’une matrice d’ADN. Pour le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit, cela fait référence à la liaison non spécifique d’une sonde mutée à l’ADN de type sauvage.

Tableau 9. Résumé des résultats pour la LoB.

Test IDH1	LoB (valeur Ct)
R132H	Pas d’amplification
R132C	Pas d’amplification
R132S	Pas d’amplification
R132G	Pas d’amplification
R132L	Pas d’amplification

Sur la base de cette analyse, la LoB pour le test a été déterminée comme étant l’absence de valeur Ct.

13.1.2. Limite de détection

La limite de détection (LoD) est définie comme la fréquence allélique la plus basse de la mutation IDH1 R132 (dans un bruit de fond d'ADN de type sauvage) qu'il est possible de détecter dans 95 % des cas. L'ADN génomique a été extrait d'échantillons de sang total (ST) et de BMA (aspirat de moelle osseuse) enrichis d'ADN de la lignée cellulaire mutante R132, puis dilué dans de l'ADN normalisé extrait d'échantillons cliniques de type sauvage de ST et de BMA. L'ADN génomique a été dilué en série pour obtenir des niveaux de % MAF supérieurs, égaux et inférieurs à la LoD estimée pour chaque test.

Au moins 60 réplicats de chaque dilution de % de fréquence d'allèles mutants (MAF) de la série à un faible niveau d'entrée d'ADN ont été testés en utilisant trois lots de kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit. La LoD pour chaque test a été déterminée à l'aide d'un modèle Probit (Tableau 10).

Tableau 10. Résumé des résultats pour la LoD.

Test IDH1	LoD (% MAF)
R132H	1,25
R132C	2,70
R132S	4,70
R132G	3,20
R132L	2,90

La LoD a été vérifiée sur toute la plage de validité des lots de kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

13.1.3. Seuil du dosage

Le seuil du dosage est une valeur ΔC_t spécifique utilisée pour déterminer si un échantillon est classé comme positif ou négatif pour une mutation IDH1 R132. Les échantillons qui génèrent des valeurs ΔC_t égales ou inférieures au seuil sont classés comme positifs pour la mutation

R132 (c.-à-d. mutation R132 détectée) et les valeurs ΔCt générées au-dessus du seuil sont classées comme négatives pour la mutation R132 (c.-à-d. aucune mutation détectée). Les taux de faux négatifs et de faux positifs pour chaque dosage spécifique d'une mutation IDH1 ont été utilisés pour déterminer une valeur seuil pour chaque dosage de mutation, de sorte qu'un résultat égal ou inférieur au seuil entraînera une classification « IDH1 Mutation Detected ». Le seuil pour chaque dosage au sein du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit est indiqué dans le Tableau 11.

Tableau 11. Synthèse des valeurs seuils du dosage

Test IDH1	Valeur seuil du dosage (valeur ΔCt)
R132H	14,75
R132C	14,75
R132S	14,75
R132G	14,75
R132L	14,75

13.1.4. Plage de quantité d'ADN génomique en entrée

La quantité d'ADN introduite est définie comme la quantité totale d'ADN amplifiable dans un échantillon, telle que déterminée par la valeur Ct de la réaction de contrôle. Pour démontrer que les performances du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit sont constantes sur l'ensemble de la plage de travail de la réaction de contrôle (CWR) (21,54–25,25 Ct), une dilution en série à 7 niveaux de différentes quantités d'ADN introduites a été testée (les niveaux les plus élevés et les plus bas se situant en dehors de la CWR). Cette étude a été réalisée pour le type sauvage et pour chacune des cinq mutations R132 (à 1,5× LoD), ainsi que pour le sang total (ST) et l'aspirat de moelle osseuse (BMA).

L'évaluation a été réalisée en utilisant trois lots *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit avec six réplicats testés par niveau de concentration d'ADN (deux réplicats par lot de kit). Les données ont été

analysées à l'aide d'une analyse de régression afin de déterminer la plage de linéarité. Pour que le test soit considéré comme linéaire sur toute la plage de concentration d'ADN, il ne doit y avoir aucun changement du ΔC_t sur l'ensemble de la plage pour les échantillons positifs pour la mutation (c.-à-d. aucun effet linéaire, quadratique ou cubique statistiquement significatif). Pour l'échantillon de type sauvage, pour que le test soit considéré comme linéaire sur toute la plage de concentration d'ADN, il doit y avoir un effet linéaire statistiquement significatif du C_t de contrôle par rapport au niveau de dilution et aucun effet quadratique ou cubique statistiquement significatif.

Les estimations des paramètres pour les dilutions testées ont démontré la linéarité pour tous les échantillons. Une plage de ΔC_t et de C_t de contrôle linéaire a été observée sur l'ensemble de la plage de quantités d'ADN testée pour le dosage.

13.1.5. Exactitude de la mesure

Précision

La répétabilité du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit a été évaluée en testant des échantillons artificiels à deux niveaux de mutation ($1 \times LoD$ et $2 \times LoD$) à la quantité d'ADN standard de 5 ng/ μ L ; des échantillons de type sauvage aux quantités d'ADN standard (5 ng/ μ L) et faible (3,5 ng/ μ L) ont été testés sur un site (situé au Royaume-Uni). Les échantillons ont été testés en triple exemplaire lors de quatre séries par échantillon sur plusieurs jours, avec différents instruments Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM et opérateurs, et en utilisant trois lots d'*ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit pour générer un total d'au moins 106 réplicats par échantillon (Tableau 12 et Tableau 13).

Tableau 12. Répétabilité du dosage pour les échantillons d’aspirat de moelle osseuse*

Mutation	Niveau	Proportion fractionnaire de résultats valides	Résultats corrects (%)	Limite inférieure bilatérale IC à 95 %
Type sauvage	3,5 ng/µL	108 / 108	100,00	96,64
	5 ng/µL	106 / 106	100,00	96,58
R132H	1× LoD	106 / 108	98,15	93,47
	2× LoD	107 / 107	100,00	96,61
R132C	1× LoD	105 / 106	99,06	94,86
	2× LoD	108 / 108	100,00	96,64
R132S	1× LoD	99 / 106	93,40	86,87
	2× LoD	108 / 108	100,00	96,64
R132G	1× LoD	107 / 108	99,07	94,95
	2× LoD	108 / 108	100,00	96,64
R132L	1× LoD	107 / 108	99,07	94,95
	2× LoD	108 / 108	100,00	96,64

* Nombre de résultats corrects et limites de confiance à 95 % bilatérales inférieures pour chaque mutation IDH1 à 1× et 2× la LoD, et pour les échantillons de type sauvage testés sur un site.

Tableau 13. Répétabilité de l’essai pour les échantillons de sang total*

Mutation	Niveau	Proportion fractionnaire de résultats valides	Résultats corrects (%)	Limite inférieure bila- térale IC à 95 %
Type sauvage	3,5 ng/µL	107 / 107	100,00	96,61
	5 ng/µL	108 / 108	100,00	96,64
R132H	1× LoD	108 / 108	100,00	96,64
	2× LoD	107 / 107	100,00	96,61

Mutation	Niveau	Proportion fractionnaire de résultats valides	Résultats corrects (%)	Limite inférieure bila- térale IC à 95 %
R132C	1× LoD	107 / 108	99,07	94,95
	2× LoD	107 / 107	100,00	96,61
R132S	1× LoD	97 / 108	89,81	82,51
	2× LoD	107 / 107	100,00	96,61
R132G	1× LoD	106 / 107	99,07	94,90
	2× LoD	108 / 108	100,00	96,64
R132L	1× LoD	105 / 106	99,06	94,86
	2× LoD	106 / 106	100,00	96,58

* Nombre de résultats corrects et limites de confiance à 95 % bilatérales inférieures pour chaque mutation IDH1 à 1× et 2× la LoD, et pour les échantillons de type sauvage testés sur un site.

13.1.6. Précision intermédiaire

La précision du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit au sein du laboratoire (répétabilité) a été évaluée. La précision des valeurs ΔC_t (la différence des valeurs C_t entre une réaction de mutation et la réaction de contrôle) pour les échantillons de test positifs et les valeurs C_t de contrôle pour les échantillons de test négatifs sont indiquées dans le Tableau 14.

Tableau 14. Précision intermédiaire du ΔC_t et du C_t de contrôle*

Type d'échantillon	Variable d'analyse	Mutation cible	Dosage	N	Moyenne	Précision intermédiaire (SD)
BMA	ΔC_t	R132C	RM1	108	6,17	0,8177
		R132G	RM2	108	7,22	0,6411
		R132H	RM1	107	5,92	0,6161
		R132L	RM2	108	6,54	0,3887
		R132S	RM1	108	7,68	0,5616
	Ct de contrôle	WT	RM1	106	23,67	0,0903
			RM2	106	23,72	0,1277
	ΔC_t	R132C	RM1	107	6,77	1,4127
		R132G	RM2	108	6,40	1,1413
		R132H	RM1	107	6,15	0,8026
		R132L	RM2	106	7,03	0,4312
		R132S	RM1	107	7,00	0,6764
	Ct de contrôle	WT	RM1	108	23,67	0,0890
			RM2	108	23,76	0,1123

* Moyenne et écart-type (fidélité intermédiaire) pour le ΔC_t de chaque test de mutation pour les échantillons positifs à la mutation 2x LoD, et pour le C_t de contrôle pour les échantillons WT à une concentration d'ADN de 5 ng/ μ L, incluant à la fois les types d'échantillons BMA et ST.

13.1.7. Reproductibilité

La reproductibilité du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit a été évaluée en testant des échantillons artificiels à deux niveaux de mutation (1× LoD et 2× LoD) à la concentration standard d’ADN de 5 ng/µL ; des échantillons de type sauvage aux concentrations standard (5 ng/µL) et faible (3,5 ng/µL) d’ADN ont été testés sur trois sites (un situé au Royaume-Uni et deux situés aux États-Unis). Les échantillons ont été testés en double avec six séries par échantillon sur plusieurs jours, sur différents instruments Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM et par différents opérateurs, en utilisant trois lots de kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit pour générer un total d’au moins 178 réplicats par échantillon (Tableau 15 et Tableau 16).

Tableau 15. Reproductibilité du test pour les échantillons d’aspirat de moelle osseuse*

Mutation	Niveau	Proportion fractionnaire de résultats valides	Résultats corrects (%)	Limite inférieure de l’IC à 95 % (bilatéral)
Type sauvage	3,5 ng/µL	179 / 179	100	97,96
	5 ng/µL	178 / 178	100	97,95
R132H	1× LoD	178 / 180	98,89	96,04
	2× LoD	179 / 179	100	97,96
R132C	1× LoD	177 / 178	99,44	96,91
	2× LoD	179 / 180	99,44	96,94
R132S	1× LoD	167 / 178	93,82	89,21
	2× LoD	179 / 180	99,44	96,94
R132G	1× LoD	179 / 180	99,44	96,94
	2× LoD	180 / 180	100	97,97
R132L	1× LoD	179 / 180	99,44	96,94
	2× LoD	180 / 180	100	97,97

* Nombre de résultats corrects et limites de confiance à 95 % bilatérales inférieures pour chaque mutation IDH1 à 1× et 2× la LoD, et pour les échantillons de type sauvage testés sur trois sites.

Tableau 16. Reproductibilité du test pour les échantillons de sang total*

Mutation	Niveau	Proportion fractionnaire de résultats valides	Résultats corrects (%)	Limite inférieure de l'IC à 95 % (bilatéral)
Type sauvage	3,5 ng/µL	179 / 179	100	97,96
	5 ng/µL	180 / 180	100	97,97
R132H	1× LoD	180 / 180	100	97,97
	2× LoD	179 / 179	100	97,96
R132C	1× LoD	178 / 180	98,89	96,04
	2× LoD	179 / 179	100	97,96
R132S	1× LoD	159 / 180	88,33	82,72
	2× LoD	179 / 179	100	97,96
R132G	1× LoD	178 / 179	99,44	96,93
	2× LoD	180 / 180	100	97,97
R132L	1× LoD	177 / 178	99,44	96,91
	2× LoD	178 / 178	100	97,95

* Nombre de résultats corrects et limites de confiance à 95 % bilatérales inférieures pour chaque mutation IDH1 à 1× et 2× la LoD, et pour les échantillons de type sauvage testés sur trois sites.

13.1.8. Interchangeabilité des lots

L’objet de cette étude était de démontrer que, quels que soient les lots du kit QIAamp DSP DNA Blood Mini et du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit (kit IDH1) utilisés, le statut d’appel de mutation pour tous les échantillons, dans le sang périphérique (PB) ainsi que dans l’aspirat de moelle osseuse (BMA), est cohérent pour toutes les cibles.

Afin d’évaluer l’interchangeabilité des lots des kits, cette étude a utilisé cinq échantillons de mutation (un pour chaque cible de mutation détectée par le kit IDH1) et un échantillon WT, pour chaque type d’échantillon (12 échantillons au total). Quatre réplicats d’extraction pour chaque échantillon ont été extraits à l’aide de trois lots de kits d’extraction indépendants. La concentration d’ADN pour chaque réplicat a été quantifiée et ensuite normalisée à 5 ng/µL (si

elle n'était pas déjà comprise entre 1 et 6 ng/μL). Chaque réplicat a ensuite été évalué par PCR, à raison d'un réplicat par mélange réactionnel, en utilisant trois lots de kits IDH1 indépendants.

Afin de vérifier l'interchangeabilité des lots, il était exigé que, pour toutes les combinaisons de lots des kits QIAamp DSP DNA Blood Mini et *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit, un taux de résultats corrects > 90 % soit observé pour chaque cible dans chaque type d'échantillon (PB et BMA).

Il a été observé que toutes les cibles présentaient un taux de résultats corrects > 90 %. À l'exception de R132H dans le type d'échantillon PB, un taux de résultats corrects de 100 % (36/36) a été obtenu. Le type d'échantillon PB R132H a donné un taux de résultats corrects de 91,67 % (33/36). Cela a permis de répondre à l'exigence d'interchangeabilité des lots du kit QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit et du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

13.1.9. Contamination croisée/transfert analytique

L'objectif de cette étude était d'évaluer le risque de contamination croisée du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit lorsque des échantillons positifs pour la mutation IDH1 sont testés à côté d'échantillons négatifs pour la mutation IDH1 (type sauvage). Cette étude a examiné l'ensemble du système IDH1, de l'extraction à l'amplification par PCR, et a recherché si une contamination croisée se produisait entre les échantillons, les extractions et au sein ou entre les séries d'analyses.

Cette étude a été réalisée avec des échantillons de sang total (ST) ou d'aspirat de moelle osseuse (BMA) positifs pour la mutation (soit R132C, soit R132L) et de type sauvage. Deux séries indépendantes d'échantillons ont été extraites en suivant une matrice d'extraction prédéfinie conçue pour introduire un risque de contamination croisée entre les échantillons.

La contamination croisée lors de l'extraction a été testée sur six extractions, et la contamination croisée lors de la PCR a été testée sur six séries de PCR, en suivant une matrice de série conçue pour introduire un risque de contamination croisée entre les échantillons. Les

séries d'extraction et de PCR ont été préparées consécutivement par le même opérateur (un opérateur par série indépendante d'échantillons) à l'aide du même équipement, sans qu'aucune autre série n'ait été préparée avec cet instrument entre ces séries et en utilisant des instruments distincts pour chaque série d'échantillons. Un lot de kit QIAamp DSP DNA Blood Mini et un lot de kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit ont été utilisés tout au long de cette étude.

Au total, 144 répliquats de type sauvage ont été testés, et aucun répliquat de type sauvage n'a généré de résultat « mutation détectée » pour R132C ou R132L. Ceci démontre donc l'absence de contamination croisée des échantillons de type sauvage par des échantillons positifs pour une mutation partageant la même procédure d'extraction d'ADN et de préparation de série.

13.1.10. Manipulation des prélèvements

Cette étude a évalué la variabilité de la manipulation des échantillons au cours du processus d'extraction de l'ADN à l'aide du kit QIAamp DSP DNA Blood Mini. Des échantillons de sang total (ST) et d'aspirat de moelle osseuse (BMA) ont été testés dans trois laboratoires indépendants. Chacun des trois sites a traité quatre extractions par échantillon (12 échantillons – cinq échantillons présentant une mutation IDH1 et un échantillon de type sauvage, pour les deux types d'échantillons), ce qui a généré un total de 144 extraits d'ADN individuels.

Tous les échantillons ont été rendus anonymes avant l'extraction. Chaque échantillon a été extrait, quantifié et normalisé sur les sites respectifs, puis testé à l'aide du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit chez QIAGEN Manchester.

Sur l'ensemble des échantillons de mutations et de type sauvage (WT), la proportion de résultats corrects était de 100 %, ce qui démontre la reproductibilité et la répétabilité du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR à l'étape préanalytique de l'extraction d'ADN.

13.1.1.1. Substances interférentes (spécificité analytique)

L'étude visait à évaluer l'impact des substances exogènes et endogènes sur les performances du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit. L'étude comprenait au moins neuf réplicats pour chaque type d'échantillon (sang total et aspirat de moelle osseuse) et chaque statut mutationnel (type sauvage, R132H et R132G), en combinaison avec chaque interférent.

Les substances exogènes présentes dans le processus d'extraction de l'ADN ont été testées par surcharge de l'éluat d'ADNg après l'extraction de l'ADN et la normalisation. Les échantillons testés avec des interférents exogènes potentiels ont été surchargés à des concentrations représentant le niveau le plus élevé possible de transfert de la substance interférente dans un échantillon. Les substances exogènes testées étaient les suivantes :

- EDTA-K2
- Lysis Buffer (Tampon de lyse)
- QIAGEN Protease
- Éthanol
- Tampon AW1
- Tampon AW2

Des substances endogènes, y compris des produits pharmaceutiques et des substances biologiques naturelles, ont été ajoutées à des échantillons de sang total ou d'aspirat de moelle osseuse avant l'extraction de l'ADN. Les concentrations de test ont été déterminées sur la base des valeurs $C_{\max}$ (3 fois la concentration d'une substance attendue dans l'échantillon du patient) ou des recommandations CLSI EP07-ED3. Les substances endogènes testées comprenaient :

- Cytarabine
- Décitabine

- Étoposide
- Chlorhydrate d'idarubicine
- Chlorhydrate de daunorubicine
- Azacitidine
- Phosphate de fludarabine
- Hémoglobine
- Bilirubine non conjuguée
- Cholestérol
- Albumine
- Triglycérides

Jusqu'à quatre substances exogènes ou quatre substances endogènes ont été regroupées à l'aide d'un seul solvant, et les échantillons dopés ont été comparés à un échantillon témoin ne contenant que du solvant. Si nécessaire, les substances individuelles d'un mélange ayant présenté un effet d'interférence ont ensuite été testées séparément.

Il a été observé que la cytarabine, la décitabine, l'étoposide, le chlorhydrate d'idarubicine, le chlorhydrate de daunorubicine, l'azacitidine et les triglycérides pouvaient réduire les taux de validité des échantillons pour les échantillons à faible quantité d'ADN, mais n'ont pas conduit à des résultats incorrects.

Le phosphate de fludarabine, l'hémoglobine, la bilirubine non conjuguée, le cholestérol, l'albumine et toutes les substances exogènes testées ont satisfait aux critères d'acceptation, ne démontrant aucun impact significatif sur les performances du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit.

13.2. Performances cliniques

13.2.1. Sensibilité et spécificité diagnostique

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit (kit IDH1) a été comparé à un test de référence par séquençage de nouvelle génération (NGS), le panel Archer VariantPlex Core Myeloid (validé par ICON), chez des patients atteints de LMA nouvellement diagnostiqués (en utilisant à la fois des échantillons de BMA et de PB, Tableau 17). La sensibilité diagnostique globale était de 98,48 % (intervalle de confiance (IC) binomial (exact) de Clopper-Pearson à 95 % : [91,84 %, 99,96 %]) et la spécificité diagnostique était de 100 % (IC à 95 % : [96,11 %, 100 %]) (Tableau 18).

Tableau 17. Kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR vs test de référence (ICON NGS) pour la LMA nouvellement diagnostiquée – Analyse de toutes les mutations

Fréquence		Test de référence		
		Mutation IDH1 détectée	Mutation IDH1 non détectée	Total
Kit <i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR	Mutation IDH1 détectée	65	0	65
	Mutation IDH1 non détectée	1	93	94
	Total	66	93	159

Tableau 18. Sensibilité et spécificité diagnostiques pour la LAM nouvellement diagnostiquée – Analyse de toutes les mutations

	Fréquences	Performances cliniques	Limite inférieure de l'IC à 95 % (bilatéral)	Limite supérieure de l'IC à 95 % (bilatéral)
Sensibilité diagnostique	65 / 66	98,48	91,84	99,96
Spécificité diagnostique	93 / 93	100,00	96,11	100,00

L'analyse de la performance clinique a également été réalisée par mutation, comme présenté dans Tableau 19 et Tableau 20.

Tableau 19. Kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit vs test de référence (ICON NGS) pour la LAM nouvellement diagnostiquée – Analyse par mutation

Fréquence		Test de référence							Total
		Mutation non détectée	R132C	R132G	R132H	R132H et R132C	R132L	R132S	
Kit <i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR	Mutation non détectée	93	1	0	0	0	0	0	94
	R132C	0	39	0	0	0	0	0	39
	R132G	0	0	5	0	0	0	0	5
	R132H	0	0	0	16	0	0	0	16
	R132H et R132C	0	0	0	0	1	0	0	1
	R132L	0	0	0	0	0	1	0	1
	R132S	0	0	0	0	0	0	3	3
	Total	93	40	5	16	1	1	3	159

Tableau 20. Sensibilité et spécificité diagnostiques pour la LMA nouvellement diagnostiquée – Analyse par mutation

Mutation	Sensibilité diagnostique	IC bilatéral à 95 %	Spécificité diagnostique	IC bilatéral à 95 %
R132C	97,6 % (40 / 41)	87,1 %, 99,9 %	100,00 % (118 / 118)	96,92 %, 100,00 %
R132G	100,0 % (5 / 5)	47,8 %, 100,0 %	100,00 % (154 / 154)	97,63 %, 100,00 %
R132H	100,0 % (17 / 17)	80,5 %, 100,0 %	100,00 % (142 / 142)	97,44 %, 100,00 %
R132L	100,0 % (1 / 1)	2,5 %, 100,0 %	100,00 % (158 / 158)	97,69 %, 100,00 %
R132S	100,0 % (3 / 3)	29,2 %, 100,0 %	100,00 % (156/156)	97,66 % ; 100,00 %

13.3. Utilité/efficacité clinique du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit avec le traitement par TIBSOVO en association avec l’azacitidine dans la LAM nouvellement diagnostiquée

Les sujets sélectionnés dans l’étude clinique AG120-C-009 pour lesquels des résultats Abbott RealTime IDH1 CTA étaient disponibles ont été inclus pour évaluer la concordance entre le test Abbott (CTA) et le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit (CDx). Le nombre maximal d’échantillons restants positifs pour les mutations IDH1 selon le test CTA et répondant aux critères d’inclusion/exclusion de l’étude ont été inclus dans l’analyse de pontage.

À la date de clôture des données du 18 mars 2021, 146 sujets positifs pour la mutation IDH1 (avec le CTA) avaient été identifiés et répartis de manière aléatoire pour recevoir soit l’ivosidénib (TIBSOVO) + azacitidine (N = 72), soit un placebo + azacitidine (N = 74).

À partir de cet ensemble d’analyse complet (FAS), des sujets ont été exclus pour les raisons suivantes :

- Retrait de l'étude : 12 sujets, et absence de consentement pour des tests ultérieurs : 8 sujets
- Échantillons collectés en Chine : 12 sujets, exclus en raison de restrictions à l'exportation
- Aucun échantillon restant disponible : 2 sujets

Après ces exclusions, 112 échantillons restaient disponibles pour l'étude de pontage (Bridging Study).

Sur ces 112 échantillons, 111 étaient positifs pour la mutation IDH1 avec le CTA et constituaient l'ensemble de pontage positif. Un échantillon avait été randomisé sur la base d'un test local et était négatif au CTA; il a donc servi d'échantillon de pontage négatif. Veuillez noter que deux échantillons n'étaient pas évaluable et que deux autres échantillons ont été testés en dehors du flux de travail, ce qui donne un total de 107 échantillons évaluable.

En outre, un sous-ensemble distinct de sujets négatifs au CTA a été utilisé pour générer l'ensemble d'échantillons négatifs. Au total, 148 échantillons négatifs au CTA étaient disponibles pour être testés avec le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit afin d'identifier les patients éligibles à un traitement par ivosidenib (TIBSOVO) associé à l'azacitidine. De plus, pour déterminer l'efficacité clinique à l'aide du kit IDH1, comme le montre l'amélioration de la survie sans événement (SSE) et d'autres résultats cliniques conformes à l'étude clinique AG120-C-009.

L'étude de pontage était une analyse rétrospective non interventionnelle utilisant des échantillons de BMA et de sang périphérique (PB) restants de patients atteints de LAM nouvellement diagnostiquée. Les objectifs principaux de l'étude de pontage étaient d'évaluer la concordance entre le kit *ipsogen*IDH1 RGQ PCR Kit et le CTA d'Abbott et d'évaluer la capacité du kit IDH1 à identifier les patients éligibles à un traitement par ivosidénib (TIBSOVO) associé à l'azacitidine. En outre, l'étude visait à déterminer l'efficacité clinique à l'aide du kit *ipsogen*IDH1 RGQ PCR Kit, comme le montre l'amélioration de la survie sans événement (SSE) et d'autres résultats cliniques conformes à l'étude clinique AG120-C-009.

La population de l'étude était représentative en ce qui concerne les données démographiques, les caractéristiques de la maladie et le type d'échantillon. Aucun déséquilibre significatif n'a été observé entre les sujets évaluable par CDx et les sujets non évaluables.

13.4. Concordance clinique

L'étude de pontage clinique a démontré que le pourcentage de concordance positive (PPA) et le pourcentage de concordance négative (NPA) respectaient le seuil de concordance prédéfini de $\geq 95\%$, établissant ainsi la concordance entre le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit et le CTA d'Abbott.

Les résultats de concordance étaient les suivants :

- PPA : 95,33 % (102/107 ; IC à 95 % : 89,43–98,47)
- NPA : 99,31 % (144/145 ; IC à 95 % : 96,22–99,98)
- Pourcentage d'accord global (OPA) : 97,62 % (246/252 ; IC à 95 % : 94,89–99,12)

Tableau 21. Concordance entre le kit IDH1 (CDx) et le CTA d'Abbott, le CTA étant la méthode de référence

Statut de mutation CDx		Statut de mutation CTA	
Fréquence	Mutation détectée	Pas de mutation détectée	Total
Mutation détectée	102	1	103
Pas de mutation détectée	5	144	149
Total	107	145	252

13.5. Efficacité clinique

L'efficacité clinique du kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit a été évaluée par l'analyse des résultats thérapeutiques chez des patients atteints de LAM nouvellement diagnostiqués et identifiés comme porteurs de la mutation IDH1 par le CDx. Ces résultats, y compris la survie sans

événement (SSE), ont été comparés à l’efficacité clinique observée dans l’étude AG120-C-009, dans laquelle la sélection des patients a été effectuée à l’aide du test Abbott RealTime IDH1 CTA.

Tableau 22 présente la SSE pour les deux groupes de traitement de l’étude AG120-C-009 sur la base de l’efficacité clinique, et Tableau 23 pour les deux groupes de traitement de l’étude AG120-C-009 sur la base des résultats positifs du CDx.

Tableau 22. Résultats de l’essai clinique sur la survie sans événement (AG120-C-009)

	Tibsovo + azacitidine (N = 72)	Placebo + azacitidine (N = 74)
Sujets (%) présentant des événements	46 (63,9 %)	62 (83,8 %)
Taux de SSE (%) (IC à 95 %)		
1 jour	41,7 % (30,2 %, 52,7 %)	20,3 % (12,0 %, 30,0 %)
3 mois	41,7 % (30,2 %, 52,7 %)	20,3 % (12,0 %, 30,0 %)
6 mois	39,9 % (28,6 % ; 51,0 %)	20,3 % (12,0 %, 30,0 %)
9 mois	39,9 % (28,6 % ; 51,0 %)	20,3 % (12,0 %, 30,0 %)
12 mois	37,4 % (25,9 % ; 48,9 %)	12,2 % (4,3 % ; 24,4 %)
18 mois	33,3 % (20,9 %, 46,2 %)	6,1 % (0,7 %, 20,9 %)
24 mois	22,2 % (6,6 %, 43,4 %)	0,0 % (–, –) NE*
36 mois	0,0 % (–, –) NE	0,0 % (–, –) NE*
Rapport de risque (par rapport au placebo + azacitidine) (stratifié)	0,33	
IC à 95 %	(0,16 ; 0,69)	
Valeur p pour HR = 1 (unilatérale)	0,0011	

* NE = Non évaluable.

Tableau 23. Résumé de la survie sans événement globale basée sur les résultats du CDx pour la population 1

	Tibsovo + azacitidine (N = 50)	Placebo + azacitidine (N = 52)
Sujets (%) présentant des événements	32 (64 %)	46 (88,5 %)
Sujets (%) sans événement (censurés)	18 (36,0 %)	6 (11,5 %)
Taux de SSE (%) (IC à 95 %)		
1 jour	40,0 % (26,5 %, 53,1 %)	13,5 % (5,9 %, 24,1 %)
3 mois	40,0 % (26,5 %, 53,1 %)	13,5 % (5,9 %, 24,1 %)
6 mois	37,8 % (24,5 %, 51,0 %)	13,5 % (5,9 %, 24,1 %)
9 mois	37,8 % (24,5 %, 51,0 %)	13,5 % (5,9 %, 24,1 %)
12 mois	37,8 % (24,5 %, 51,0 %)	9,0 % (2,4 % ; 21,1 %)
18 mois	37,8 % (24,5 %, 51,0 %)	9,0 % (2,4 % ; 21,1 %)
24 mois	25,2 % (7,4 % ; 48,2 %)	0,0 % (-, -) NE*
36 mois	0,0 % (-, -) NE	0,0 % (-, -) NE*
Rapport de risque (par rapport au placebo + azacitidine) (stratifié)	0,438	
IC à 95 %	(0,254 ; 0,757)	
Valeur p pour HR = 1 (unilatéral)	0,0016	

* NE = Non évaluable.

Par rapport à la population d'efficacité de l'essai clinique, une répartition égale entre les groupes de traitement a été observée chez les sujets CDx+ et le pourcentage d'événements entre les groupes était similaire à celui de la population d'efficacité de l'essai clinique. Le rapport de risque (HR) pour l'essai clinique était de 0,33 et statistiquement significatif (0,0011) (Tableau 22) ; le HR pour l'efficacité pour la population CDx+ était de 0,438 et statistiquement significatif (0,0016) (Tableau 23). Bien que le HR CDx soit plus élevé que celui de l'efficacité de l'essai clinique, il y a toujours une amélioration par rapport au placebo car

les HR CTA et CDx sont < 1 , ce qui signifie que le traitement est efficace et qu'ils sont tous deux statistiquement significatifs.

- La SSE et les critères d'évaluation secondaires chez les patients CDx-positifs étaient cohérents avec les principaux résultats de l'essai clinique.

Le kit *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit a démontré une concordance élevée avec le test utilisé lors de l'essai clinique et a permis d'identifier efficacement les patients atteints de LMA nouvellement diagnostiquée (ND) éligibles à une thérapie ciblée.

13.6. Résumé de la sécurité et des performances

Le résumé de la sécurité et des performances est disponible sur le site Web EUDAMED.

14. Références

1. Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., ... & Su, S. M. (2009). Les mutations IDH1 associées au cancer produisent du 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274), 739-744.
2. Chowdhury, R., Yeoh, K. K., Tian, Y. M., Hillringhaus, L., Bagg, E. A., Rose, N. R., ... & Kawamura, A. (2011). L'oncométabolite 2-hydroxyglutarate inhibe les histone lysine déméthylases. *EMBO reports*, 12(5), 463-469.
3. Pirozzi, C. J., & Yan, H. (2021). Implications des mutations IDH pour le développement du cancer et le traitement. *Nature reviews Clinical oncology*, 18(10), 645-661.
4. Zarnegar-Lumley, S., Alonzo, T. A., Gerbing, R. B., Othus, M., Sun, Z., Ries, R. E., ... & Tarlock, K. (2023). Caractéristiques et impact pronostique des mutations IDH dans la LAM : une analyse COG, SWOG et ECOG. *Blood Advances*, 7(19), 5941-5953.
5. Bezerra, M. F., Larrazábal, B. R., Lima, A. S., Mello, M. R., Pimentel, R. F., Weinhäuser, I., ... & Lucena-Araujo, A. R. (2022). Dépistage des mutations myéloïdes chez les patients atteints de syndromes myélodysplasiques et de AML présentant des modifications liées à la myélodysplasie. *Hematology, transfusion and cell therapy*, 44(3), 328-331.
6. DiNardo, C. D., Ravandi, F., Agresta, S., Konopleva, M., Takahashi, K., Kadia, T., ... & Kantarjian, H. (2015). Caractéristiques, issue clinique et signification pronostique des mutations IDH dans la LAM. *American journal of hematology*, 90(8), 732-736.
7. Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC). (Wellcome Sanger Institute). Base de données COSMIC Disponible à l'adresse : <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

15. Guide de résolution de problèmes

Ce guide de résolution de problèmes peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour plus d'informations, consultez également la page Foire aux questions de notre Centre d'assistance technique : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques de l'assistance technique QIAGEN sont à votre disposition pour répondre à toutes vos questions concernant les informations et/ou les protocoles de ce manuel ou les technologies de préparation des échantillons et de dosage (pour les coordonnées, visitez www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

Indicateur « NO_CT_VALUE » dans le témoin positif (PC)

- | | |
|--|--|
| a. Mauvaise configuration de la PCR | Vérifiez le processus de pipetage et répétez la PCR. |
| b. Les conditions de conservation d'un ou plusieurs composants du kit n'étaient pas conformes aux instructions fournies dans la section « Stockage et manipulation des réactifs ». | Vérifier les conditions de conservation (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit si nécessaire. |

Indicateur « UNEXPECTED_CT_VALUE » dans le témoin négatif (NTC)

- | | |
|--|---|
| a. Une contamination s'est produite lors de la préparation de la PCR | Assurez-vous que la zone a bien été décontaminée. Répétez la PCR avec de nouveaux réactifs. Si possible, fermez les tubes de PCR juste après l'addition de l'échantillon à tester. Assurez-vous que la surface de travail et les instruments sont décontaminés régulièrement. |
|--|---|

Indicateur « ABOVE_ACCEPTABLE_RANGE » ou « BELOW_ACCEPTABLE_RANGE » dans le CP

- | | |
|--|--|
| a. Erreur lors de la préparation de la PCR | Répétez la PCR en vérifiant que le pipetage est correctement effectué. |
|--|--|

Indicateur « DNA_INPUT_TOO_HIGH » dans le tube d'échantillon

- | | |
|-------------------------------------|---|
| a. L'échantillon est trop concentré | Répétez Quantification et normalisation de l'ADN. Les échantillons doivent être dilués en utilisant l'eau fournie dans le kit (eau pour dilution ; [Dil.]). |
|-------------------------------------|---|

Indicateurs « ABOVE_ACCEPTED_RANGE » et « NO_CT_VALUE » dans le tube d'échantillon

- a. Matrice d'ADN présente au départ dans l'échantillon en quantité insuffisante

Répétez Quantification et normalisation de l'ADN. Les échantillons doivent être dilués en utilisant l'eau fournie dans le kit (eau pour dilution ; [Dil.]). Après un nouveau test, si la valeur Ct de contrôle est toujours non valide, procédez à une nouvelle extraction de l'échantillon. Si la valeur Ct de contrôle n'est pas valide après une nouvelle extraction et deux séries de tests supplémentaires, l'échantillon doit être signalé comme ayant un statut de mutation indéterminé.

16. Symboles

Les symboles suivants peuvent figurer dans le mode d’emploi ou sur l’emballage et les étiquettes :

Symbole	Définition du symbole
	Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions
	Date limite d’utilisation
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Référence du matériel (c.-à-d. étiquetage des composants)
	Composants
	Contient
	Numéro
	Code article international
	Identificateur unique d’appareil
Rn	R désigne une révision du mode d’emploi et n représente le numéro de révision

Symbole	Définition du symbole
	Limites de température
	Fabricant
	Consulter le mode d'emploi
	Conserver à l'abri de la lumière directe du soleil
	Avertissement/Attention
	Danger pour la santé
	Environnement

17. Coordonnées

Pour bénéficier d'une assistance technique et obtenir plus d'informations, consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse support.qiagen.com.

18. Informations sur les commandes

Produit	Contenu	No. n°.
<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit	Pour 24 réactions : IDH1 Reaction Mix 1, IDH1 Reaction Mix 2, IDH1 Positive Control, Taq Polymerase, Eau pour NTC, Eau pour dilution d'échantillon	675223
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit — pour la purification de l'ADN génomique à partir de sang total ou d'aspirat de moelle osseuse		
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	Pour 50 préparations d'ADN : 50 colonnes de centrifugation QIAamp Mini, QIAGEN Proteinase, tampons, tubes de collecte (2 mL)	61104
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM et accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Thermocycleur de PCR en temps réel et analyseur de fusion haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, cramoisi) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : inclut Garantie d'un an sur les pièces et la main-d'œuvre, installation et formation	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Thermocycleur de PCR en temps réel et analyseur de fusion haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, carmin) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : inclut Garantie de 1 an sur les pièces et la main-d'œuvre, installation et formation non incluses	9002032
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Bloc d'aluminium pour la préparation manuelle de la réaction avec un(e) seul(e) pipette multicanaux dans 72 tubes de 0,1 mL	9018901
72-Well Rotor	Pour maintenir les barrettes de tubes et les bouchons, 0,1 mL, avec des volumes réactionnels de 10 à 50 µl ; nécessite un Locking Ring 72 Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Pour maintenir en place les barrettes de tubes et bouchons, 0,1 mL dans le 72-Well Rotor	9018904
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 barrettes de 4 tubes et bouchons pour 1 000 réactions	981103

Produit	Contenu	No. n°.
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10 x 250 barrettes de 4 tubes et bouchons pour 10 000 réactions de 10–50 µL	981 106

Pour obtenir des informations actualisées sur les licences et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consulter le mode d’emploi des kits QIAGEN respectifs. Les modes d’emploi des kits QIAGEN sont disponibles sur www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès du support technique QIAGEN ou de votre distributeur local.

19. Historique des révisions du document

Révision	Description
R1, juin 2026	Version initiale

Accord de licence limitée pour le kit *ipsogen*® IDH1 RGQ PCR

En utilisant ce produit, l’acheteur ou l’utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit doit être utilisé uniquement avec les composants du panel, conformément aux protocoles fournis avec le produit et à ce mode d’emploi. QIAGEN n’accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce panel avec tout autre composant non fourni dans ce panel, à l’exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce mode d’emploi et dans d’autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Certains de ces protocoles supplémentaires ont été fournis par les utilisateurs de QIAGEN pour les utilisateurs de QIAGEN. Ces protocoles n’ont pas été testés de manière approfondie ni optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne les garantit pas et ne garantit pas qu’ils ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n’offre aucune garantie indiquant que ce panel et/ou sa ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce panel et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L’acheteur et l’utilisateur du panel consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d’actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de ce Contrat de licence limité par tout tribunal et pourra recouvrir tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d’avocats, en cas d’action en application de Contrat de licence limité ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au panel et/ou à ses composants.

Pour consulter les conditions de licence mises à jour, rendez-vous sur www.qiagen.com.

Marques déposées : QIAGEN®, Sample to Insight®, *ipsogen*®, QIAcube®, Rotor-Gene®, QIAamp®, Rotor-Gene AssayManager®, HotStarTaq® (Groupe QIAGEN) ; TaqMan® (Groupe Roche), TIBSOVO® (Servier Pharmaceuticals LLC). Les noms déposés, les marques de commerce, etc., cités dans ce document, même s’ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

06/2026 HB-3744-001 © 2026 QIAGEN, tous droits réservés.

