

Instructions d'utilisation

CE IVD

Test IdentiClone® *IGK* Gene Clonality Assay

Conditions de conservation : **-85°C à -65°C**
(Les ADN contrôles peuvent être séparés des kits de test et conservés entre 2°C et 8°C)

N° de référence

REF 91020020
REF 91020030

Produits

IdentiClone *IGK* Gene Clonality Assay – Gel Detection
IdentiClone *IGK* Gene Clonality Assay MegaKit – Gel Detection

Quantité

33 réactions
330 réactions

Table des matières

1.	UTILISATION PREVUE	3
2.	RESUME ET EXPLICATION DU TEST	3
2.1.	Contexte.....	3
2.2.	Résumé.....	3
3.	PRINCIPES DE LA PROCEDURE	4
3.1.	Amplification en chaîne par polymérase (PCR).....	4
3.2.	Détection sur gel.....	4
4.	REACTIFS	5
4.1.	Composants des réactifs.....	5
4.2.	Avertissements et précautions.....	6
4.3.	Conservation et manipulation.....	6
5.	INSTRUMENTS	7
5.1.	Thermocycleur.....	7
5.2.	Unité d'électrophorèse.....	7
5.3.	Unité à radiation UV.....	7
6.	PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	8
6.1.	Précautions.....	8
6.2.	Substances interférentes.....	8
6.3.	Conditions de prélèvement et manipulation.....	8
6.4.	Préparation de l'échantillon.....	8
6.5.	Conservation des échantillons.....	8
7.	PROCEDURE DE TEST	9
7.1.	Matériel fourni.....	9
7.2.	Matériel nécessaire (mais non fourni).....	9
7.3.	Préparation des réactifs.....	10
7.4.	Amplification.....	11
7.5.	Détection sur gel – analyse d'hétéroduplex.....	11
7.6.	Contrôle qualité.....	12
7.7.	Contrôles positifs recommandés.....	12
8.	INTERPRETATION DES RESULTATS	12
8.1.	Analyse.....	12
8.2.	Interprétation de l'échantillon.....	13
9.	LIMITES DE LA PROCEDURE	13
10.	VALEURS ATTENDUES	14
10.1.	Taille attendue des produits amplifiés.....	14
10.2.	Données de l'échantillon.....	14
11.	CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE	15
12.	BIBLIOGRAPHIE	16
13.	ASSISTANCE TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT	16
14.	SYMBOLES	16
15.	INFORMATIONS LEGALES	17
15.1.	Garantie et responsabilité.....	17
15.2.	Brevets et marques.....	17
15.3.	Avis à l'acheteur – ADN polymérase EagleTaq UNIQUEMENT.....	17

1. Utilisation prévue

Le test IdentiClone *IGK* Gene Clonality Assay est un produit de diagnostic *in vitro* destiné à la détection des réarrangements clonaux de gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline par amplification en chaîne par polymérase (PCR, polymerase chain reaction) chez les patients suspectés d'être atteints de syndromes lymphoprolifératifs et peut notamment être utilisé pour :

- Identifier la clonalité dans le cas de syndromes lymphoprolifératifs atypiques
- Étayer un diagnostic différentiel entre lésions réactives et hémopathies malignes
- Déterminer la lignée présumée dans le cas de syndromes lymphoprolifératifs monoclonaux matures
- Identifier des marqueurs tumoraux spécifiques (réarrangements d'*IGK* et *IGK-K_{de}*) pour la surveillance après traitement
- Surveiller et évaluer la récurrence de la maladie

2. Résumé et explication du test

2.1. Contexte

Les réarrangements de gènes du récepteur antigénique se produisent pendant l'ontogenèse des lymphocytes B et T. Ces réarrangements de gènes génèrent des produits de longueur et de séquence uniques pour chaque cellule. Par conséquent, les analyses par amplification en chaîne par polymérase (PCR) peuvent être utilisées pour identifier les populations de lymphocytes issues d'une seule cellule en détectant les réarrangements de gène V-J uniques présents dans ces loci du gène du récepteur antigénique.¹ Cette analyse par PCR utilise différentes amorces ADN consensus ciblant les régions génétiques conservées au sein du gène de chaîne lourde d'immunoglobuline. Ce test permet de détecter la majeure partie des tumeurs malignes à lymphocytes B clonaux à partir de l'ADN. Les produits des tests peuvent être analysés avec de nombreux formats de détection, notamment par électrophorèse sur gel ou capillaire.

Les tests IdentiClone d'Invivoscribe représentent une nouvelle approche de l'analyse de clonalité par PCR. Ces tests standardisés ont été soigneusement optimisés en analysant des échantillons de contrôles positifs et négatifs à l'aide de mélanges mères (master mixes) de PCR multiplexe. Le développement des tests a été suivi d'une validation importante comprenant l'analyse de plus de 400 échantillons cliniques à l'aide de la classification REAL (Revised European/American Lymphoma). L'analyse a été réalisée dans plus de trente centres d'analyse importants et indépendants dans toute l'Europe dans le cadre d'une étude collaborative connue sous le nom de BIOMED-2 Concerted Action (Action Concertée BIOMED-2).²

Les tests basés sur une détection sur gel ne peuvent détecter de manière fiable les populations clonales représentant moins de 5 % de la population totale de lymphocytes. Toujours interpréter les résultats des tests de clonalité moléculaire en tenant compte des données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.

2.2. Résumé

Ce kit d'analyse contient trois (3) mélanges mères. Le mélange mère (master mix) *IGK* Tube A cible les régions variable (V) et de jonction (J) du locus de la chaîne légère kappa d'immunoglobuline. En revanche, le mélange mère *IGK* Tube B cible les réarrangements de séquence dite *K_{de}* avec la région variable (V) et la région intragénique *Jκ-Cκ*. Les réarrangements *Vκ-K_{de}* et *Jκ-Cκ* intron-*K_{de}* obtenus sont le résultat de réarrangements infructueux conservés par le lymphocyte B. Le troisième mélange mère, Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle), cible plusieurs gènes et génère une série d'amplicons d'environ 100, 200, 300, 400 et 600 paires de bases (pb) afin de garantir que la qualité et la quantité d'ADN introduit soient suffisantes pour l'obtention d'un résultat fiable. Un seul programme de thermocycleur et des méthodologies de détection similaires sont utilisés pour tous nos tests de clonalité génique. Cela améliore la cohérence et facilite l'apprentissage croisé d'une large gamme de tests différents.

Ce test est basé sur EuroClonality/BIOMED-2 Concerted Action (Action Concertée EuroClonality/BIOMED-2) BMH4-CT98-3936.



3. Principes de la procédure

3.1. Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Les analyses PCR sont utilisées en routine pour l'identification de populations clonales de lymphocytes B. Ces tests amplifient l'ADN entre les amorces qui ciblent les régions variable (V) et de jonction (J) (*IGK Tube A*), ou les régions variable, J κ -C κ intron et K $_{de}$ (*IGK Tube B*). Les régions V et J conservées s'étendent de part et d'autre de la région hypervariable déterminant la complémentarité 3 (CDR3, complementarity-determining region 3) marquée par des réarrangements génétiques programmés pendant la maturation de tous les lymphocytes B et T. Les gènes du récepteur antigénique qui subissent un réarrangement sont ceux des chaînes lourdes et des chaînes légères de l'immunoglobuline des lymphocytes B, ainsi que les gènes des récepteurs des lymphocytes T. Chaque lymphocyte B et T possède un seul réarrangement V-J fonctionnel dont la longueur et la séquence sont uniques. Ainsi, quand l'ADN d'une population normale ou polyclonale est amplifié avec des amorces ADN qui flanquent la région V-J, une courbe en cloche (distribution gaussienne) des produits d'amplification est générée dans la plage de taille attendue. Sur gel, cette distribution des produits apparaît sous la forme d'une traînée. Cette distribution gaussienne reflète la population hétérogène des réarrangements V-J. (Dans certains cas, en l'absence d'ADN de lymphocyte, aucun produit n'est visible). L'ADN provenant d'échantillons contenant une population clonale donne un résultat correspondant à un ou deux produits amplifiés (amplicons) majeurs sur un fond polyclonal réduit.

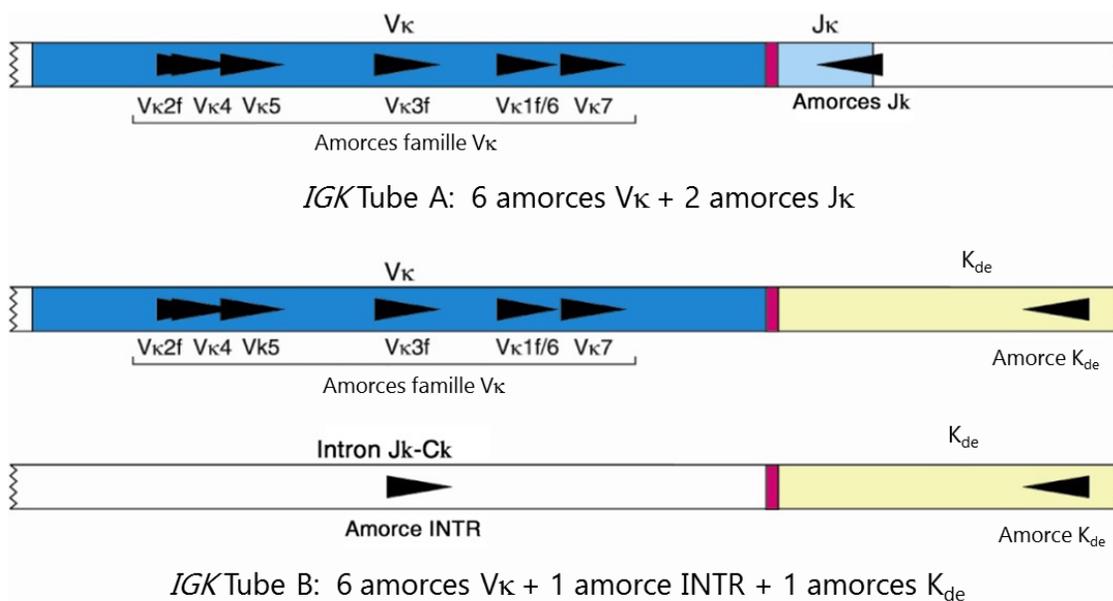


Figure 1. On voit ici une représentation simple de l'organisation du gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline réarrangé sur le chromosome 2p11.2. La figure montre les positions et orientations relatives pour les amorces de V κ , J κ et K $_{de}$, qui sont présentes dans les tubes de mélanges mères IGK.

Les gènes des récepteurs antigéniques étant polymorphiques (composés d'une population hétérogène de séquences d'ADN apparentées), il est difficile d'utiliser un seul jeu de séquences d'ADN amorces pour cibler toutes les régions adjacentes conservées autour du réarrangement V-J. La diversité de la région N et les mutations somatiques modifient encore plus les séquences d'ADN de ces régions. Ainsi, les mélanges mères de multiplexes ciblant plusieurs régions FR sont nécessaires à l'identification de la majorité des réarrangements clonaux. Comme indiqué, les réarrangements clonaux sont identifiés comme un ou deux produits majeurs de taille unique sur le fond de produits amplifiés de tailles variables qui forment une distribution gaussienne autour d'un réarrangement de taille moyenne statistiquement majoritaire. Pour les réarrangements V κ -J κ , la longueur de CDR3 est limitée et les réarrangements dans cette région montrent une déviation significative (distribution platykurtique).⁴ Les produits PCR présentent ainsi une distribution gaussienne très étroite, et il est plus facile et fiable de les identifier par analyse d'hétéroduplex.

3.2. Détection sur gel

Le gel d'électrophorèse, tel que le gel d'agarose ou le gel d'électrophorèse non dénaturant de polyacrylamide (PAGE), est couramment employé pour séparer les différents produits d'amplification selon leur taille, leur charge et leur conformation. L'ADN étant chargé négativement, lorsqu'un potentiel électrique (tension) est appliqué au gel contenant les produits PCR, le champ électrique entraîne la migration des amplicons à travers le gel. Les fragments d'ADN les plus petits peuvent migrer facilement dans la matrice du gel, alors que les fragments d'ADN les plus grands migrent plus lentement. Cela entraîne la séparation des produits d'amplification en fonction de leur taille. Le bromure d'éthidium ou d'autres colorants intercalant de l'ADN peuvent alors être utilisés pour colorer et détecter ces produits dans le gel.

Une analyse d'hétéroduplex peut aussi être réalisée sur gel de polyacrylamide pour différencier les produits PCR clonaux des

non-clonaux. L'analyse d'hétéroduplex correspond à une dénaturation des produits PCR à température élevée, puis à une réhybridation rapide des brins d'ADN par une réduction soudaine de la température. Cela entraîne un appariement incorrect d'une grande partie des brins d'ADN à d'autres brins non homologues créant des boucles dans l'ADN. Ces boucles réduisent de manière significative la capacité de l'ADN à migrer à travers le gel de polyacrylamide. Cependant, si la majorité des produits PCR sont clonaux, lors d'une analyse d'hétéroduplex, la plupart des produits PCR se réhybrident correctement avec des brins homologues. Ces produits PCR passent normalement dans le gel de polyacrylamide. Ainsi, dans un échantillon clonal avec un fond polyclonal, une analyse d'hétéroduplex montre que la plupart des produits polyclonaux avancent beaucoup plus lentement dans le gel de polyacrylamide, ce qui augmente leur séparation et la capacité à identifier la ou les bandes clonales.

4. Réactifs

4.1. Composants des réactifs

Tableau 1. Kits disponibles

N° de référence	Description	Quantité
REF 91020020	IdentiClone <i>IGK</i> Gene Clonality Assay – Gel Detection	33 réactions
REF 91020030	IdentiClone <i>IGK</i> Gene Clonality Assay MegaKit – Gel Detection	330 réactions

Tableau 2. Composants du réactif

Réactif	N° de référence	Composants du réactif (substances actives)	Quantité unitaire	91020020 Nbre d'unités	91020030 Nbre d'unités	Temp. de conservation
Mélanges mères (Master Mixes)	21020010CE	IGK Tube A – Unlabeled (IGK Tube A - Non marqué) Oligonucléotides multiples ciblant les régions variable et de jonction du gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline en solution saline tamponnée.	1 500 µL	1	10	
	21020020CE	IGK Tube B – Unlabeled (IGK Tube B - Non marqué) Oligonucléotides multiples ciblant les régions variable, Jκ-Cκ intron et K _{de} du gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline en solution saline tamponnée.	1 500 µL	1	10	
Mélange mère (master mix) témoin d'amplification	20960020	Specimen Control Size Ladder – Non marqué (marqueur de taille contrôle – non marqué) Oligonucléotides multiples ciblant des gènes domestiques.	1 500 µL	1	10	
ADN contrôle positif	40880370	IVS-0007 Clonal Control DNA (ADN contrôle clonal) 200 µg/mL d'ADN dans une solution TE à 1/10 ^e	100 µL	1	5	
ADN contrôle négatif (normal)	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN contrôle polyclonal) 200 µg/mL d'ADN dans une solution TE à 1/10 ^e	100 µL	1	5	ou 

Remarque : aucun conservateur n'est utilisé dans la fabrication de ce kit.

4.2. Avertissements et précautions

- **IVD** Ce produit est destiné au diagnostic *in vitro*.
- Le kit d'essai forme un système qui doit être utilisé tel quel. Ne pas remplacer les réactifs par ceux d'un autre fabricant. Une dilution, une réduction des volumes des réactions d'amplification ou tout autre écart par rapport à ce protocole peut affecter la performance de ce test et/ou annuler toute sous-licence limitée accordée avec l'achat de ce kit.
- Les produits sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.
- Le strict respect du protocole garantit une performance ainsi qu'une reproductibilité optimales. Veiller à utiliser le programme de thermocycleur adéquat, les autres programmes pouvant donner des résultats imprécis/faussés, comme des faux positifs et des faux négatifs. Ne pas mélanger ou combiner les réactifs de kits comportant des numéros de lots différents.
- Porter un équipement de protection individuelle (EPI) approprié et suivre les bonnes pratiques de laboratoire et les précautions universelles lors de la manipulation des échantillons. Manipuler les échantillons dans des installations de confinement de sécurité biologique approuvées et ouvrir les récipients uniquement dans une enceinte de sécurité biologique certifiée. Utiliser de l'eau de qualité « biologie moléculaire » pour la préparation de l'échantillon d'ADN.
- En raison de la sensibilité analytique de ce test, prendre de très grandes précautions pour éviter la contamination des réactifs ou des mélanges d'amplification avec des échantillons, des contrôles ou des matériels amplifiés. Contrôler attentivement tous les réactifs pour détecter tout signe de contamination (*p.ex.* contrôles négatifs donnant des signaux positifs). Jeter les réactifs suspectés d'être contaminés.
- Afin réduire le risque de contamination, porter des gants propres lors de la manipulation des échantillons et des réactifs et nettoyer systématiquement les plans de travail et les pipettes avant de réaliser la PCR.
- L'autoclavage n'élimine pas l'ADN issu d'une contamination. La progression du travail doit se faire en sens unique dans le laboratoire réalisant la PCR : commencer par la préparation des mélanges mères, suivie de la préparation des échantillons puis de l'amplification, et terminer par la détection. N'introduire aucun ADN amplifié dans les zones réservées à la préparation du mélange mère ou des échantillons.
- Réserver toutes les pipettes et les pointes de pipette ainsi que tout le matériel utilisé dans une zone particulière à cette zone du laboratoire.
- Utiliser du matériel plastique jetable et stérile dans la mesure du possible pour éviter une contamination de RNase, DNase ou une contamination croisée.

4.3. Conservation et manipulation

- Si les kits de test ne sont pas utilisés immédiatement, ils doivent être **conservés entre -85°C et -65°C**.
- La température de conservation optimale des ADN contrôles est comprise entre 2°C et 8°C, mais les ADN contrôles peuvent également être conservés à long terme entre -85°C et -65°C.
- Tous les réactifs et les contrôles doivent être décongelés et vortexés ou mélangés soigneusement avant utilisation pour une remise en suspension complète. Un vortexage excessif pourrait endommager l'ADN et causer la perte des fluorophores des amorces marquées.
- Les matériels sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.
- En raison de la concentration élevée en sel, les mélanges mères de PCR sont sensibles aux cycles de congélation/décongélation. Si nécessaire, aliquoter les mélanges mères en cryotubes à bouchon à vis avec joint.

5. Instruments

5.1. Thermocycleur

- Utilisation ou fonction : amplification d'échantillons d'ADN
- Caractéristiques de performance et spécifications :
 - Plage de température minimale : 15 à 96°C
 - Vitesse minimale de montée en température : 0,8°C/s
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et d'entretien du fabricant.
- Voir la section 7.4 *Amplification* pour le programme du thermocycleur.

5.2. Unité d'électrophorèse

- Utilisation ou fonction : séparation de fragments d'ADN
- Caractéristiques de performance et spécifications :
 - Capable de fonctionner entre 35 V et 135 V pendant des durées prolongées
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.

5.3. Unité à radiation UV

- Utilisation ou fonction : détection de l'ADN
- Caractéristiques de performance et spécifications :
 - Capable d'émettre une radiation à une longueur d'onde de ~302 nm
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.

6. Prélèvement et préparation des échantillons

6.1. Précautions

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

6.2. Substances interférentes

Les substances suivantes peuvent interférer avec la PCR :

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

6.3. Conditions de prélèvement et manipulation

Ce test analyse l'**ADN génomique** provenant des sources suivantes :

- 5 cm³ de sang périphérique, biopsie médullaire ou aspiration de moelle osseuse anticoagulés avec de l'héparine ou de l'EDTA (conservés entre 2°C et 8°C et expédiés à température ambiante)
- 5 mm³ minimum de tissu (conservé et expédié congelé ou conservé et expédié en RPMI 1640 à température ambiante ou dans de la glace)
- 2 µg d'ADN génomique (conservé entre 2°C et 8°C et expédié à température ambiante)
- Tissu ou coupes fixés au formol et inclus en paraffine (conservés et expédiés à température ambiante)

6.4. Préparation de l'échantillon

Extraire l'ADN génomique des échantillons du patient dès que possible. Remettre en suspension l'ADN à une concentration finale de 100 µg à 400 µg par mL dans 1/10^e de TE (1 mM de Tris-HCl, pH 8,0 ; 0,1 mM d'EDTA) ou dans de l'eau de qualité de biologie moléculaire ou USP. Il s'agit d'un système d'analyse sensible. Une large gamme de concentrations d'ADN générera un résultat fiable. Par conséquent, la quantification et l'ajustement des concentrations d'ADN ne sont généralement pas nécessaires. L'analyse de l'échantillon d'ADN avec le mélange mère Specimen Control Size Ladder garantit qu'un ADN de qualité en quantité suffisante était présent pour produire un résultat fiable.

6.5. Conservation des échantillons

Conserver l'ADN génomique entre 2°C et 8°C ou entre -85°C et -65°C jusqu'à utilisation.

7. Procédure de test

7.1. Matériel fourni

Tableau 3. Matériel fourni

N° de référence	Description
21020010CE	<i>IGK</i> Tube A – Unlabeled (<i>IGK</i> Tube A – Non marqué)
21020020CE	<i>IGK</i> Tube B – Unlabeled (<i>IGK</i> Tube B – Non marqué)
20960020	Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (marqueur de taille contrôle – non marqué)
40880370	IVS-0007 Clonal Control DNA (ADN contrôle clonal)
40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN contrôle polyclonal)

7.2. Matériel nécessaire (mais non fourni)

Tableau 4. Matériel nécessaire (mais non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs ou matériels recommandés et fournisseurs	N° de référence	Remarques
ADN polymérase	Roche : <ul style="list-style-type: none"> DNA polymerase EagleTaq Invivoscribe, Inc. : <ul style="list-style-type: none"> DNA polymerase (ADN polymérase) EagleTaq¹ ou équivalent	05206944190 60970100	S.O.
Eau distillée désionisée de qualité biologique moléculaire ou USP	S.O.	S.O.	L'eau doit être stérile et exempte de toute DNase et RNase.
Pipettes étalonnées	Rainin : <ul style="list-style-type: none"> Pipettes P-2, P-20, P-200 et P-1000 Ou pipettes SL-2, SL-20, SL-200 et SL-1000 	S.O.	Précision requise pour mesurer des volumes allant de 1 µL à 1 000 µL
Thermocycleur	Bio-Rad : <ul style="list-style-type: none"> MJ Research PTC-100 ou PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer <ul style="list-style-type: none"> PE 9600 ou PE 9700 	S.O.	S.O.
Vortex	S.O.		S.O.
Plaques ou tubes PCR	S.O.		Stériles
Pointes de pipette à filtre	S.O.		Stériles, exemptes de RNase/DNase/pyrogène
Microtubes à centrifuger	S.O.		Stériles
Unité d'électrophorèse sur gel	S.O.		Pour gels de polyacrylamide
Bromure d'éthidium	Thermo Fisher Scientific® : <ul style="list-style-type: none"> UltraPure® 10 mg/ml Ethidium Bromide (bromure d'éthidium) 	15585-011	S.O.
Gels de polyacrylamide à 6 %	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Novex® TBE Gels (6 %, 12 puits) 	EC62652Box	S.O.
Tampon de migration TBE	Invitrogen : <ul style="list-style-type: none"> Novex TBE Running Buffer (5X) [tampon de migration Novex TBE (5X)] 	LC6675	Diluer au 1/5e avant utilisation.
Tampon de charge du gel	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer (tampon de charge 10X BlueJuice™) 	10816-015	S.O.

Tableau 4. Matériel nécessaire (mais non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs ou matériels recommandés et fournisseurs	N° de référence	Remarques
Tampon de charge du gel	<ul style="list-style-type: none"> Novex Hi-Density TBE Sample Buffer (5X) [tampon d'échantillon Novex Hi-Density TBE (5X)] 	LC6678	S.O.
100 bp DNA ladder (marqueur de taille ADN de 100 pb)	Invitrogen : <ul style="list-style-type: none"> TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (échelle d'ADN de 100 pb TrackIt™) 	10488-058	S.O.

Remarque : la commercialisation et l'utilisation de ce produit sont approuvées dans l'Espace économique européen uniquement. Il est interdit de revendre ce produit ou de le transférer à un tiers. Consultez également les informations légales à la section 15.

7.3. Préparation des réactifs

- Analyser tous les échantillons inconnus avec le mélange mère Specimen Control Size Ladder afin de s'assurer que les échantillons d'ADN ne contiennent pas d'inhibiteur d'amplification et qu'ils sont de qualité adéquate et en quantité suffisante pour générer des résultats fiables.
- Un seul résultat par échantillon est acceptable ; cependant, il est recommandé de **dupliquer** chaque échantillon dans la mesure du possible. Si l'analyse dupliquée fournit des résultats incohérents, une nouvelle analyse ou réévaluation de l'échantillon est nécessaire.
- Analyser les contrôles positifs, négatifs et sans matrice** pour chaque mélange mère.

7.3.1. Enfiler des gants et retirer les mélanges mères du congélateur. Laisser les tubes décongeler complètement ; puis vortexer doucement pour mélanger.

7.3.2. Sous une hotte de confinement, aliquoter un volume approprié de chaque mélange mère dans des microtubes à centrifuger individuels propres et stériles.

- Les volumes d'aliquote sont de 45 µL pour chaque réaction.
 - Ajouter un volume mère supplémentaire toutes les 15 réactions pour corriger les erreurs de pipetage. Ainsi, pour chaque mélange mère (à l'exception du Specimen Control Size Ladder), le nombre de réactions (n) doit être :
- | | |
|----------------------------------|--|
| n = 2 × nb d'échantillons | (analyser chaque échantillon en double) |
| + 1 | ADN contrôle positif (voir la section 7.7 Contrôles positifs recommandés) |
| + 1 | ADN contrôle négatif (IVS-0000 Polyclonal Control DNA [ADN contrôle polyclonal]) |
| + 1 | contrôle négatif sans ADN (eau) |
| + 1 | pour corriger les erreurs de pipetage |

n = 2 × nb d'échantillons + 4 Total

- Par conséquent, le volume d'aliquote total pour chaque mélange mère = n × 45 µL.
- Pour le mélange mère Specimen Control Size Ladder, le nombre de réactions (m) doit être :

- | | |
|------------------------------|--|
| m = nb d'échantillons | (analyser chaque échantillon en double) |
| + 1 | ADN contrôle positif (IVS-0000 Polyclonal Control DNA [ADN contrôle polyclonal]) |
| + 1 | contrôle négatif sans ADN (eau) |
| + 1 | pour corriger les erreurs de pipetage |

m = nb d'échantillons + 3 Total

- Par conséquent, le volume d'aliquote total pour le mélange mère Specimen Control Size Ladder doit être **m × 45 µL**.

7.3.3. Ajouter 1,25 unités (ou 0,25 µL à 5 U/µL) de DNA polymerase (ADN polymérase) Taq par réaction à chaque mélange mère.

- La quantité totale de DNA polymerase (ADN polymérase) Taq ajoutée à chaque mélange mère = **n × 0,25 µL** et **m × 0,25 µL** pour le mélange mère Specimen Control Size Ladder.
- Vortexer doucement pour mélanger.

7.3.4. Pour chaque réaction, aliquoter 45 µL du mélange mère approprié + la solution d'ADN polymérase dans les puits individuels d'une plaque ou dans un tube PCR.

- 7.3.5. Ajouter 5 µL de matrice appropriée (échantillon d'ADN, ADN contrôle positif, ADN contrôle négatif ou eau) aux puits individuels contenant les solutions de mélange mère respectives.
- Aspirer et expulser plusieurs fois avec la pipette pour mélanger.
- 7.3.6. Reboucher ou couvrir la plaque PCR.
- Les échantillons sont maintenant prêts à être amplifiés dans le thermocycleur.
 - Si l'amplification ne peut pas être réalisée immédiatement après la préparation des réactifs, la plaque ou les tubes PCR peuvent être conservés entre 2°C et 8°C pendant 24 heures.

Guide pratique :

Pour chaque mélange mère et n réactions, mélanger :

n × 45 µL de mélange mère

n × 0,25 µL de DNA polymerase (ADN polymérase) Taq

Vortexer doucement pour mélanger.

Aliquoter **45 µL** de mélange mère + solution d'ADN polymérase dans chaque puits de réaction.

Ajouter **5 µL** de matrice appropriée dans chaque puits

Volume total de réaction = **50 µL**

7.4. Amplification

- 7.4.1. Amplifier les échantillons en utilisant le programme PCR suivant :

- Utiliser l'option **calculated** (calculée) pour la mesure de la température avec les thermocycleurs BioRad MJ Research PTC.

Tableau 5 : Conditions de thermocyclage

Étape	Température	Durée	Cycles
1	95°C	7 minutes	1
2	95°C	45 secondes	35
3	60°C	45 secondes	
4	72°C	90 secondes	
5	72°C	10 minutes	1
6	15°C	∞	1

- 7.4.2. Retirer la plaque ou les tubes d'amplification du thermocycleur.

- Bien que l'ADN amplifié soit stable à température ambiante pour des périodes de temps prolongées, les produits PCR doivent être conservés entre 2°C et 8°C jusqu'à détection.
- La détection doit être effectuée dans les 30 jours suivant l'amplification.

7.5. Détection sur gel – analyse d'hétéroduplex

- Ne pas réaliser d'analyse d'hétéroduplex sur les produits PCR du mélange mère Specimen Control Size Ladder. Ignorer les étapes 7.5.1 à 7.5.3 et passer directement à l'étape 7.5.4.

7.5.1. Dénaturer 20 µL de produits de PCR à 94°C pendant 5 minutes.

7.5.2. Refroidir rapidement pour réhybrider les produits de PCR à 4°C (dans un bain d'eau glacée) pendant 60 minutes.

7.5.3. Préparer l'unité d'électrophorèse avec un gel de polyacrylamide TBE à 6 % non dénaturant et un tampon de migration 1X TBE.

7.5.4. Mélanger 20 µL de chaque échantillon avec 5 µL de tampon de charge non dénaturant de bleu de bromophénol 5X réfrigéré.

7.5.5. Déposer les 20 µL de mélange dans les puits individuels du gel.

7.5.6. Brancher le gel à 110 V pendant 2 à 3 heures ou 40 à 50 V toute une nuit.

- La tension et la durée de l'électrophorèse dépendent de la taille de l'amplicon de PCR et de l'épaisseur du gel de polyacrylamide.
- La tension et le temps de migration peuvent être ajustés en conséquence.

7.5.7. Colorer les gels dans 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium (dans de l'eau ou du tampon 0,5X TBE) pendant 5 à 10 minutes.

7.5.8. Rincer les gels dans de l'eau pendant 5 à 10 minutes. Changer l'eau et recommencer.

7.5.9. Placer le gel sous lampes UV pour visualiser les bandes.

7.5.10. Photographier et interpréter les résultats. (Voir les sections 8 : *Interprétation des résultats* et 10 *Valeurs attendues* ci-dessous.)

7.6. Contrôle qualité

Les contrôles positifs et négatifs (ou normaux) sont fournis avec le kit et peuvent être analysés une seule fois à chaque fois qu'une analyse est réalisée pour assurer une performance correcte de l'analyse. Analyser en outre un contrôle négatif sans ADN (*par ex.* de l'eau) pour tester la contamination du mélange mère ou la contamination croisée des réactions PCR due à une technique stérile incorrecte. Un contrôle tampon peut aussi être ajouté afin de garantir l'absence de contamination du tampon employé pour remettre en suspension les échantillons. Les valeurs des contrôles positifs sont fournies dans la section 10.1 *Taille attendue des produits amplifiés*. Des contrôles supplémentaires et des contrôles de sensibilité (dilutions des contrôles positifs dans notre contrôle négatif) sont disponibles auprès d'Invivoscribe.

7.7. Contrôles positifs recommandés

Les tailles d'amplicon indiquées ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI.

Tableau 6 : Taille attendue des contrôles recommandés

Mélange mère	Cible	ADN de contrôle	N° de référence	Taille du produit en nucléotides (nt)
IGK Tube A	V _K - J _K	Plage de taille attendue IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	120 - 160, 190 - 210, 260 - 300 143
IGK Tube B	V _K - K _{de} + intron-K _{de}	Plage de taille attendue IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	210 - 250, 270 - 300, 350 - 390 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Différents gènes	Plage de taille valide IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	100, 200, 300, 400, 600^a 100, 200, 300, 400, 600 ^a

^a**Remarque :** dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'obtenir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 600 nt.

8. Interprétation des résultats

Bien que des résultats positifs soient une forte indication de tumeur maligne, les résultats positifs et négatifs peuvent être interprétés en tenant compte de toutes les informations cliniques et des résultats des analyses biologiques. La plage de taille attendue pour chaque mélange mère a été déterminée en analysant les échantillons contrôles négatifs et positifs. Pour une interprétation précise et significative, il est important d'ignorer les pics situés en dehors de la plage de taille attendue de chaque mélange mère.

8.1. Analyse

- 8.1.1. Les échantillons pour lesquels l'amplification échoue après des essais répétés peuvent être signalés comme suit « **Aucun résultat ne peut être fourni concernant cet échantillon, car il contenait de l'ADN en quantité ou qualité insuffisante pour l'analyse** ».
- 8.1.2. Répéter l'analyse des échantillons pour lesquels elle a été négative si la réaction du contrôle positif a échoué.
- 8.1.3. Si des échantillons analysés en double fournissent des résultats différents, les analyser et/ou évaluer à nouveau au cas où ils auraient été permutés.
- 8.1.4. Tous les contrôles des tests doivent être examinés avant l'interprétation des résultats des échantillons. Si les contrôles ne fournissent pas les résultats attendus, l'analyse n'est pas fiable et les échantillons ne peuvent pas être interprétés.

Tableau 7 : Le tableau suivant décrit l'analyse de chaque contrôle ainsi que les décisions nécessaires en fonction des résultats.

Type de contrôle	Résultat attendu	Résultat aberrant
Contrôle sans matrice	Aucune amplification, continuer l'analyse.	Amplification présente, répéter le test.
Contrôle polyclonal	La taille du produit est cohérente avec la taille attendue figurant dans la section 10.1 <i>Taille attendue des produits amplifiés</i> . Aucun réarrangement clonal n'est présent. Continuer l'analyse.	Des réarrangements clonaux sont présents. Répéter le test.
Contrôle positif (Peut aussi être un contrôle d'extraction si le matériel du contrôle positif est prélevé par un procédé d'extraction.)	La taille du produit est cohérente avec la taille attendue figurant dans la section 10.1 <i>Taille attendue des produits amplifiés</i> . Continuer l'analyse.	Répéter l'analyse
Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle) (Ce contrôle d'amplification est <u>essentiel</u> pour les échantillons de quantité et qualité inconnues.)	Si tous les pics de 100, 200, 300, 400, et 600 nt sont visibles, continuer l'analyse. Dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'obtenir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 600 nt. Continuer l'analyse.	Si aucune bande n'est visible, répéter le test <u>sauf si l'échantillon est positif</u> . Si seulement 1, 2 ou 3 bandes sont visibles, évaluer de nouveau l'échantillon afin de détecter une éventuelle dégradation de l'ADN <u>sauf si l'échantillon est positif</u> .

8.2. Interprétation de l'échantillon

Dans la mesure où les contrôles produisent les résultats attendus, les échantillons cliniques peuvent être interprétés comme suit :

- Une ou deux bande(s) positive(s) proéminente(s)^a dans la plage de taille attendue sont interprétées comme suit :

« Positif pour la détection de réarrangement(s) clonal(aux) de gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline indicatif de la présence d'une population cellulaire clonale. Dans le contexte d'un critère de diagnostic global, les populations cellulaires clonales peuvent indiquer la présence d'une hémopathie maligne. »

- Une absence de bande(s) positive(s)^a dans la plage de taille attendue est interprétée comme suit :

« Négatif pour la détection de réarrangement(s) clonal(aux) de gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline. »

^aRemarque : les critères de définition d'une bande positive sont les suivants :

- Les produits des échantillons figurant dans la plage de taille attendue et produisant une ou des bandes séparées distinctes de toute traînée (« smear ») de fond correspondent à des bandes positives.

9. Limites de la procédure

- Ce test n'identifie pas 100 % des populations cellulaires clonales.
- Ce test ne peut détecter, de manière fiable, moins de cinq (5) cellules positives pour 100 cellules normales.
- Toujours interpréter les résultats des tests de clonalité moléculaire en tenant compte des données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.
- Les analyses PCR sont sujettes à des interférences dues à la dégradation de l'ADN ou à l'inhibition de la PCR par l'EDTA, l'héparine ou d'autres agents.

10. Valeurs attendues

10.1. Taille attendue des produits amplifiés

Les tailles d'amplicons indiquées ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI.

Tableau 8 : Taille attendue des produits amplifiés

Mélange mère	Cible	ADN de contrôle	N° de référence	Taille du produit en nucléotides (nt)
IGK Tube A	V _K - J _K	Plage de taille attendue IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880370	120 - 160, 190 - 210, 260 - 300 135 - 155 143
IGK Tube B	V _K - K _{de} + intron-K _{de}	Plage de taille attendue IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880370	210 - 250, 270 - 300, 350 - 390 225 - 245, 265 - 285, 404 ^a 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Différents gènes	Plage de taille valide IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN contrôle polyclonal)	--- 40920010	100, 200, 300, 400, 600^b 100, 200, 300, 400, 600 ^a

^a**Remarque :** dans des conditions sous-optimales, un produit non spécifique de 404 nt peut être détecté dans le Tube B. Afin de différencier un produit spécifique d'un produit non spécifique, l'ADN contrôle négatif ne doit pas révéler cette bande au cours de la même analyse. Si une bande est présente, elle peut être considérée comme non spécifique.

^b**Remarque :** dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'obtenir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 600 nt.

10.2. Données de l'échantillon

Les données figurant à gauche ont été obtenues avec les mélanges mères indiqués. Les produits amplifiés ont été soumis à une analyse d'hétéroduplex et passés dans un gel de polyacrylamide à 6 %.

IGK Tube A

Couloir 1 = IVS-0019 100 %
Couloir 2 = IVS-0007 100 %
Couloir 3 = IVS-0007 10 %
Couloir 4 = IVS-0000 100 %

Plage de taille attendue =
120-160 pb,
190-210 pb et
260-300 pb

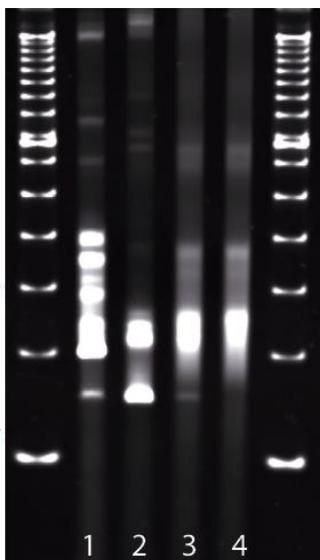


Figure 2. IGK Tube A

IGK Tube B

Couloir 1 = IVS-0019 100 %
Couloir 2 = IVS-0007 100 %
Couloir 3 = IVS-0007 10 %
Couloir 4 = IVS-0000 100 %

Plage de taille attendue =
210-250 pb,
270-300 pb et
350-390 pb

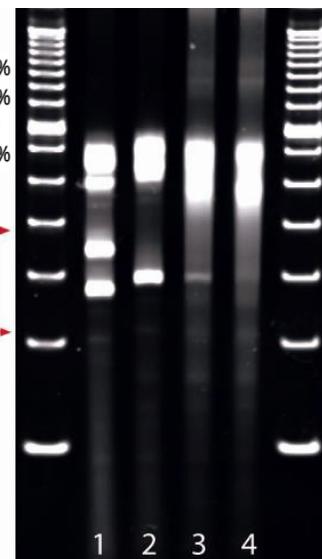


Figure 3. IGK Tube B

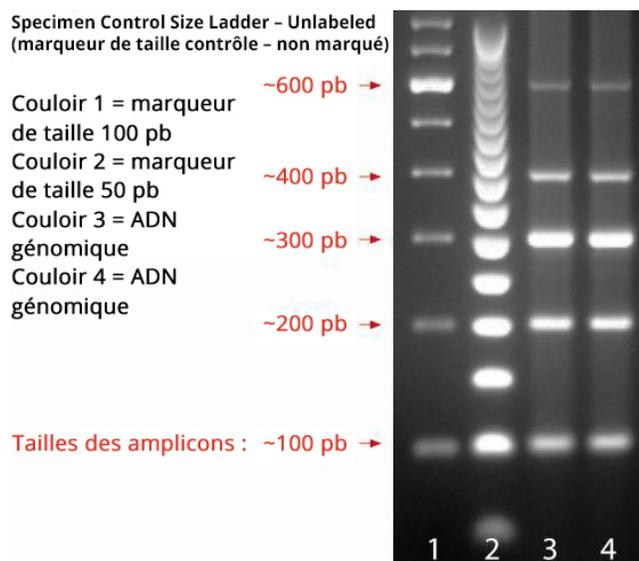


Figure 4. Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle). Les données figurant à gauche ont été obtenues avec les mélanges mères indiqués. Les produits amplifiés ont migré dans un gel d'agarose à 2 %.

11. Caractéristiques de performance

Ce test PCR IdentiClone *IGK* Gene Clonality est une procédure rapide et fiable qui est bien plus sensible que l'analyse Southern Blot (SB) dans la détection de clonalité chez les patients suspectés d'être atteints de syndromes lymphoprolifératifs. Le diagnostic clinico-histopathologique final est bien corrélé aux résultats PCR chez un nombre plus élevé de patients en comparaison avec les résultats du SB.^{2,3}

Tableau 9.10 Études de concordance

Concordance PCR/SB : ²		Concordance PCR/SB : ³	
<i>IGH</i> :	sensibilité de 93 %/spécificité de 92 %	<i>IGH + IGK</i> :	sensibilité de 85 %
<i>IGK</i> :	sensibilité de 90 %/spécificité de 90 %		
<i>IGL</i> :	sensibilité de 86 %/spécificité de 92 %	<i>TCRB</i> :	sensibilité de 85 %
<i>TCRB</i> :	sensibilité de 86 %/spécificité de 98 %		
<i>TCRG</i> :	sensibilité de 89 %/spécificité de 94 %		
<i>TCRD</i> :	sensibilité de 83 %/spécificité de 95 %		

Tableau 11. PCR vs analyse SB concernant l'histopathologie et le diagnostic final

	Concordance PCR/SB :	Sensibilité de la PCR :	Sensibilité de l'analyse SB :
<i>IGH + IGK</i> :	85 %	98 %	39 %
<i>TCRB</i> :	85 %	96 %	35 %

L'étude de Sandberg *et al.* était une étude indépendante menée sur 300 échantillons de patients appartenant à différents types d'échantillons. Lorsque les analyses ont été effectuées à la fois par PCR et SB et que les résultats pouvaient être corrélés à l'histopathologie et au diagnostic final, la précision du diagnostic des tests IdentiClone sélectionnés a été définie comme étant d'au moins 96 %. La précision est bien meilleure qu'avec une analyse SB, laquelle n'a pas détecté 23 cas évidents de tumeurs malignes et sept (7) tumeurs malignes probables dans le cadre de cette étude. L'utilisation des tests IdentiClone n'a généré aucun résultat faux positif évident et le niveau de précision était élevé.³ Outre le bénéfice manifeste de ce test, les résultats clonaux obtenus ont permis la détection ultérieure de réarrangements de gène spécifiques au patient et à la tumeur pour une détection de la maladie résiduelle minimale.

12. Bibliographie

1. Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Mol. Diag.* 1999, 4(2):101-117.
2. Van Dongen, JJM *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003, 17(12):2257-2317.
3. Sandberg, Y, van Gastel-Mol, EJ, Verhaaf, B, Lam, KH, van Dongen, JJM, Langerak, AW. BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern Blot analysis in routine clonality diagnostics. *J. Mol Diag.* 2005, 7(4):495-503.
4. Rock, EP, Sibbald, PR, Davis MM, Chein, YH. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med.* 1994, 179(1):323-328.

13. Assistance technique et service client

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

Coordonnées

Invivoscribe, Inc.
10222 Barnes Canyon Road, Bldg. 1
San Diego, CA 92121-2711
États-Unis

Représentant agréé et assistance technique UE

 Invivoscribe Technologies, SARL
Le Forum – Bât B
515 Avenue de la Tramontane
ZI Athélia IV
13600 La Ciotat, France

Téléphone : +1 858 224 6600
Fax : +1 858 224 6601
Service technique : support@invivoscribe.com
Service client : sales@invivoscribe.com
Site Internet : www.invivoscribe.com
Heures d'ouverture : 7 h - 17 h heure du Pacifique

Téléphone : +33 (0)4 42 01 78 10
Fax : +33 (0)4 88 56 22 89
Support technique : support@invivoscribe.com
Service client : sales-eu@invivoscribe.com
Site Internet : www.invivoscribe.com
Heures d'ouverture : 9 h à 17 h heure française

14. Symboles

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

	Destiné au diagnostic <i>in vitro</i>		Date de péremption
	Numéro de référence		Représentant agréé dans la Communauté européenne
	Volume de réactif		Fabricant
	Numéro de lot		Consulter le mode d'emploi
	Conditions de conservation		

15. Informations légales

15.1. Garantie et responsabilité

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) s'engage à fournir des produits de la plus haute qualité. Invivoscribe® garantit que les produits respectent ou dépassent les normes de performance décrites dans les instructions d'utilisation, pour les produits comprenant ce type de notice. Si un produit couvert par des spécifications produit ne présente pas la performance spécifiée, notre politique consiste à remplacer le produit ou rembourser le prix d'achat total. Invivoscribe® ne fournit aucune autre garantie, explicite ou implicite, de quelque nature que ce soit. La responsabilité d'Invivoscribe® est limitée au prix d'achat du produit. Invivoscribe décline toute responsabilité pour tous dommages directs, indirects, consécutifs ou accidentels découlant de l'utilisation, des résultats de l'utilisation ou de l'incapacité d'utilisation de ses produits. L'efficacité du produit dans les conditions contrôlées par l'acheteur dans le laboratoire de l'acheteur doit être déterminée et surveillée en permanence par l'acheteur selon les procédés définis et contrôlés par l'acheteur, notamment le test des contrôles positifs, négatifs et sans ADN à chaque fois qu'un échantillon est analysé. La commande, l'acceptation et l'utilisation du produit impliquent que l'acheteur accepte d'être entièrement responsable de garantir l'efficacité du produit et que l'acheteur accepte la limitation de responsabilité décrite dans ce paragraphe.

Ce produit destiné au diagnostic *in vitro* n'est pas disponible à la vente ni destiné à être utilisé en Amérique du Nord.

15.2. Brevets et marques

Ce produit est couvert par un ou plusieurs des brevets suivants : brevet européen n° 1549764, brevet européen n° 2418287, brevet européen n° 2460889, brevet japonais n° 4708029, brevet américain n° 8859748 et demandes connexes en instance et à venir. Tous les brevets et toutes les applications sont concédés sous licence exclusive à Invivoscribe®. Des brevets supplémentaires concédés sous licence à Invivoscribe pour certains de ces produits s'appliquent ailleurs. Nombre de ces produits nécessitent des méthodes d'amplification des acides nucléiques telles que l'amplification en chaîne par polymérase (PCR). Aucune licence sous ces brevets pour l'utilisation de procédés ou d'enzymes d'amplification n'est accordée expressément ou implicitement à l'acheteur par l'achat de ce produit.

IdentiClone® est une marque déposée d'Invivoscribe®.

©2020 Invivoscribe, Inc. Tous droits réservés. Les marques commerciales mentionnées dans ce document sont la propriété d'Invivoscribe, Inc. et/ou de ses filiales, ou (en ce qui concerne les marques commerciales d'autres détenteurs figurant dans ce document) de leurs propriétaires respectifs.

15.3. Avis à l'acheteur – EagleTaq DNA Polymerase (ADN polymérase EagleTaq) UNIQUEMENT

Ce produit est approuvé pour la vente et l'utilisation à des fins de recherche dans l'Espace économique européen (EEE) uniquement. Il ne doit pas être revendu ou transféré à un tiers. L'utilisation de ce produit est couverte par le brevet américain n° 6,127,155 et les demandes de brevet correspondantes en dehors des États-Unis. L'acheteur de ce produit peut utiliser cette quantité de produit uniquement afin de réaliser ses propres recherches internes. Aucun droit en vertu de toute autre demande de brevet et aucun droit de fournir des services commerciaux de quelque sorte que ce soit, y compris, mais sans s'y limiter, rapporter les résultats des activités de l'acheteur pour une contrepartie financière ou toute autre contrepartie commerciale, n'est accordé expressément, implicitement ou par préclusion. Ce produit est destiné à des fins de recherche uniquement. Les utilisations pour le diagnostic humain et vétérinaire conformément aux demandes de brevet Roche nécessitent une licence distincte de la part de Roche. Toutes les utilisations autres qu'à des fins de recherche interne et de diagnostic humain et vétérinaire conformément aux demandes de brevet Roche nécessitent une licence distincte de la part de Thermo Fisher Scientific. En utilisant ce produit, vous confirmez que vous acceptez ce qui précède. Pour obtenir de plus amples informations sur l'achat de licences de Roche, contacter le Licensing Department (service des licences) de Roche Molecular Systems, Inc., 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, California 94588, États-Unis ou Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim, Allemagne. Pour obtenir de plus amples informations sur l'achat de licences de Thermo Fisher Scientific, contacter le Licensing Department (service des licences) de Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008 aux États-Unis.