IdentiClone®

Instructions d'utilisation

CE IVD

IdentiClone® *TCRD* Gene Clonality Assay

Destiné à l'identification des réarrangements clonaux du gène de chaîne delta des récepteurs des lymphocytes T (*TCRD*).

IVD Destiné au diagnostic *in vitro*.

invivoscribe

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

Référence catalogue	Produits	Quantité
REF 92060010	IdentiClone *TCRD* Gene Clonality Assay – Gel Detection	33 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 13
   8.1. Analyse 13
   8.2. Interprétation de l'échantillon 13
9. LIMITES DE LA PROCEDURE 14
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 15
13. SUPPORT TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT 15
14. SYMBOLES 16
15. INFORMATIONS LEGALES 16
   15.1. Garantie et responsabilité 16
   15.2. Brevets et marques 16
   15.3. Avis à l'acheteur – ADN polymérase EagleTaq UNIQUEMENT 16

1. Utilisation prévue

Le test IdentiClone *TCRD* Gene Clonality Assay est un produit de diagnostic *in vitro* destiné à la détection des réarrangements clonaux du gène de chaîne delta des récepteurs des lymphocytes T par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) chez les patients suspectés d'être atteints de syndromes lymphoprolifératifs, qui peut être utilisé pour :

- Identifier la clonalité chez les patients suspectés d'être atteints de syndromes lymphoprolifératifs
- Étayer un diagnostic différentiel entre des lésions réactives et des tumeurs malignes des lymphocytes T et certaines tumeurs malignes immatures des lymphocytes B
- Déterminer l'implication de la lignée dans les syndromes lymphoprolifératifs matures
- 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 delta des récepteurs des lymphocytes T. Ce test permet de détecter la majeure partie des tumeurs malignes à lymphocytes T clonales 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 2 mélanges mères (master mixes). Les mélanges mères (master mixes) *TCRD* Tube (tube *TCRD*) ciblent les régions de structure ou « framework » au sein des régions variable (V), de diversité (D) et de jonction (J) du locus de la chaîne delta des *TCR*. Le mélange mère (master mix) 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 afin de garantir que la qualité et la quantité d'ADN introduit sont suffisantes pour l'obtention d'un résultat fiable. La procédure utilise un seul programme du thermocycleur et une méthodologie de détection similaire pour tous les tests de clonalité génique Invivoscribe, ce qui 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 tests PCR sont utilisés en routine pour l'identification de populations clonales de lymphocytes T. Ces analyses amplifient l'ADN entre les amorces qui ciblent la région conservée variable (V), la région conservée de jonction (J) et la région de diversité (D) (*TCRD* Tube). Ces régions conservées s'étendent de part et d'autre d'une zone de la région V-J marquée par des réarrangements génétiques programmés durant 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 d'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 et la distribution gaussienne reflète la population hétérogène des réarrangements V-J. Dans certains cas, lorsque l'ADN de lymphocyte n'est pas présent, aucun produit n'est détecté. Pour l'ADN provenant d'échantillons contenant une population clonale, le résultat est d'un ou deux produits amplifiés (amplicons) majeurs sur un fond polyclonal réduit.

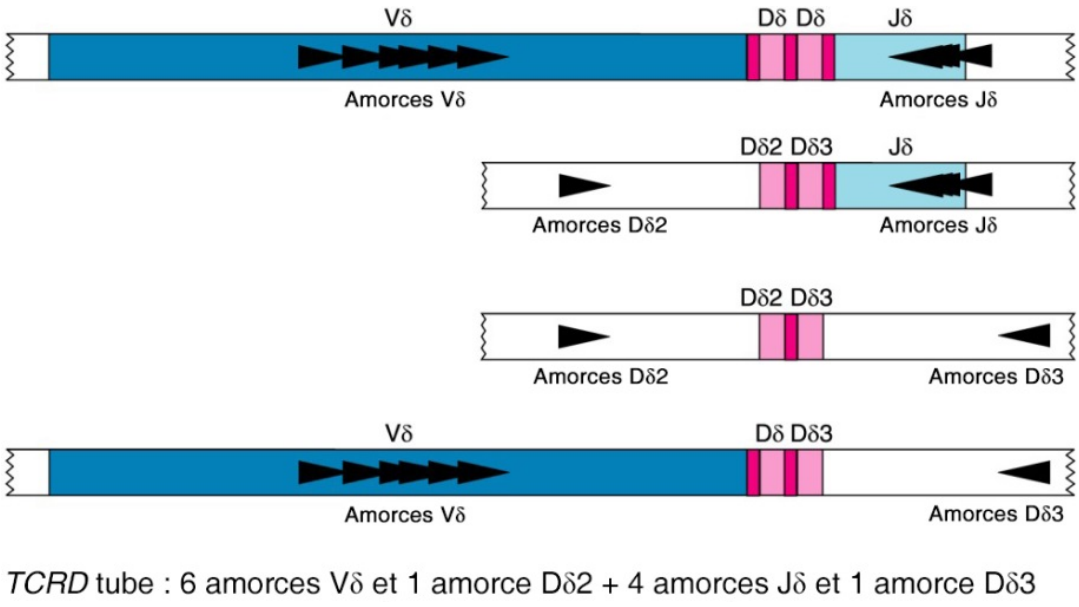

Figure 1. Voici un diagramme simplifié représentant un réarrangement du gène delta des récepteurs des lymphocytes T sur le chromosome 14 (14q11.2) montrant le positionnement approximatif des amorces d'ADN en amont et en aval. Le nombre d'amorces et leur spécificité sont indiqués pour les mélanges mères (master mixes) *TCRD* Tube.

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 (master mixes) 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.

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 plus petits peuvent migrer facilement dans la matrice du gel, alors que les fragments d'ADN plus grands migrent plus lentement, ce qui entraîne la séparation des produits d'amplification en fonction de leur taille. Le bromure d'éthidium ou d'autres colorants intercalants 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 : Tests disponibles

Référence catalogue	Description	Quantité
REF 92060010	IdentiClone *TCRD* Gene Clonality Assay – Gel Detection	33 réactions

Tableau 2 : Composants des réactifs

Réactif	Référence catalogue (REF)	Composants des réactifs (substances actives)	Quantité unitaire	92060010 Nbre d'unités	Temp. de conservation
Mélanges mères (master mixes)	22060010CE	***TCRD* Tube – Unlabeled (tube *TCRD* - Non marqué)** Oligonucléotides multiples ciblant les régions Vδ + Dδ + Jδ du gène delta des récepteurs des lymphocytes T en solution saline tamponnée.	1 500 µL	1	-85 °C à -65 °C
Mélange mère témoin d'amplification	20960020	**Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (marqueur de taille contrôle - non marqué)** Oligonucléotides multiples ciblant des gènes domestiques.	1 500 µL	1	
ADN contrôles positifs	40881210	**IVS-0021 Clonal Control DNA (ADN contrôle clonal)** 200 µg/ml d'ADN dans une solution TE à $1/10^{e}$	100 µL	1	2 °C à 8 °C ou -85 °C à -65 °C
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	

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 (master mixes), 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 (master mixes) de PCR sont sensibles aux cycles de congélation/décongélation. Si nécessaire, aliquoter les mélanges mères (master mixes) 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°C à 96°C
  - Vitesse minimale de montée en température : 0,8°C/s
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.
- Voir la section 7.4 : *Amplification* pour le programme de 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** (gDNA) des origines suivantes :

- 5 cm^3 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 mm^3 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'ADNg 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 à une température comprise entre 2°C et 8°C ou -85°C et -65°C pour une conservation à long terme.

7. Procédure de test

7.1. Matériel fourni

Tableau 3 : Composants du kit

Référence catalogue	Description
REF 22060010CE	*TCRD* Tube – Unlabeled (Tube *TCRD* – Non marqué)
REF 20960020	Specimen Control Size Ladder - Unlabeled (marqueur de taille contrôle – Non marqué)
REF 40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA (ADN contrôle clonal)
REF 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	Référence catalogue	Remarques
ADN polymérase	Roche : • DNA polymerase EagleTaq Invivoscribe, Inc. : • DNA polymerase (ADN polymérase) EagleTaq[1] ou équivalent	05206944190 60970100	S.O.
Eau distillée désionisée de qualité biologie moléculaire ou USP	S.O.	S.O.	L'eau doit être stérile et exempte de toute DNase et RNase.
Pipettes étalonnées	Rainin : • 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 : • MJ Research PTC-100 ou PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer • PE 9600 ou PE 9700	S.O.	S.O.
Vortex	S.O.	S.O.	S.O.
Plaques ou tubes PCR	S.O.	S.O.	Stériles
Pointes de pipette à filtre	S.O.	S.O.	Stériles, exemptes de RNase/DNase/pyrogène
Microtubes à centrifuger	S.O.	S.O.	Stériles
Unité d'électrophorèse sur gel	S.O.	S.O.	Pour gels de polyacrylamide
Bromure d'éthidium	Thermo Fisher Scientific : • UltraPure™ 10 mg/mL Ethidium Bromide (bromure d'éthidium)	15585-011	S.O.
Gels de polyacrylamide à 6 %	Thermo Fisher Scientific : • Novex® TBE Gels (6 %, 12 puits)	EC62652Box	S.O.
Tampon de migration TBE	Thermo Fisher Scientific : • 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 : • 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer (tampon de charge 10X BlueJuice™) • Novex Hi-Density TBE Sample Buffer (5X) [tampon d'échantillon Novex Hi-Density TBE (5X)]	10816-015 LC6678	S.O.

Tableau 4 : Matériel nécessaire (mais non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs ou matériels recommandés et fournisseurs	Référence catalogue	Remarques
100 bp DNA Ladder (marqueur de taille ADN de 100 pb)	Thermo Fisher Scientific : • TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (marqueur de taille ADN de 100 pb TrackIt™)	10488-058	S.O.

[1]**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 en utilisant 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 pour PCR 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 tubes microcentrifuges individuels propres et stériles.

- Les volumes d'aliquote sont de 45 µL pour chaque réaction.
- Ajouter une réaction 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 unité (ou 0,25 µL à 5 unités/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 doit être **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, conserver la plaque ou les tubes PCR entre 2°C et 8°C pendant 24 heures au maximum.

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 de PCR du mélange mère Specimen Control Size Ladder. Ignorer les étapes 7.5.1 à 7.5.2 et passer directement à l'étape 7.5.3.

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*)

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 sans matrice (*par ex.* de l'eau) pour tester la contamination du mélange mère ou la contamination croisée des réactions. 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 : Contrôles positifs recommandés

Mélange mère	Cible	ADN de contrôle	Référence catalogue	Taille du produit en paires de bases (pb)
***TCRD* Tube**	Vδ + Dδ + Jδ	**Plage de taille attendue** IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40881210	**120 – 280[a]** 158 (région mineure), 183
Specimen Control Size Ladder	Différents gènes	**Plage de taille valide** IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	**100, 200, 300, 400, 600[b]** 100, 200, 300, 400, 600[a]

[a]**Remarque** : Un pic de 90 pb peut être observé dans les échantillons normaux (polyclonaux).
[b]**Remarque :** Dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare que le signal du fragment de 600 pb soit diminué ou complètement absent.

8. Interprétation des résultats

Bien que des résultats positifs soient une forte indication de tumeur maligne, les résultats positifs et négatifs doivent 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. Signaler les échantillons pour lesquels l'amplification échoue après des analyses répétées comme « **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.	En présence d'une amplification, répéter l'analyse.
Contrôle polyclonal	La taille du produit est cohérente avec la taille attendue figurant dans la section 10.1: *Taille attendue des produits amplifiés*. 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: *Taille attendue des produits amplifiés*. Continuer l'analyse.	Répéter l'analyse
Specimen Control Size Ladder (Ce contrôle d'amplification est essentiel pour les échantillons de quantité et qualité inconnues.)	Si tous les pics de 100, 200, 300, 400 et 600 pb sont visibles, continuer l'analyse. Dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare que le signal du fragment de 600 bp soit diminué ou complètement absent. Continuer l'analyse.	Si aucune bande n'est visible, répéter le test sauf si l'échantillon est positif. Si seulement 1, 2 ou 3 bandes sont visibles, évaluer de nouveau l'échantillon afin de détecter une éventuelle dégradation de l'ADN sauf si l'échantillon est positif.

8.2. Interprétation de l'échantillon

Dans la mesure où les contrôles produisent les résultats attendus, interpréter les échantillons cliniques comme suit :

8.2.1. 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 la chaîne delta des récepteurs des lymphocytes T indicatif(s) 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. »**

8.2.2. Une absence de bande(s) positive(s)[a] dans la plage de taille attendue est interprétée comme :

- **« Négatif pour la détection de réarrangement(s) clonal(aux) de gène de la chaîne delta des récepteurs des lymphocytes T. »**

[a]**Remarque :** **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 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	Référence catalogue	Taille du produit en paires de bases (pb)
***TCRD* Tube**	Vδ + Dδ + Jδ	**Plage de taille attendue** IVS-0021 Clonal Control DNA IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40881210 40920010	**120 – 280[a]** 158 (région mineure), 183 130 – 280[b]
Specimen Control Size Ladder	Différents gènes	**Plage de taille valide** IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	**100, 200, 300, 400, 600[c]** 100, 200, 300, 400, 600[c]

[a]**Remarque :** Un pic de 90 pb peut être observé dans les échantillons normaux (polyclonaux).
[b]**Remarque :** Un pic non spécifique de 163 pb peut être observé dans les échantillons normaux (polyclonaux).
[c]**Remarque :** dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare que le signal du fragment de 600 pb soit diminué ou complètement absent.

10.2. Données de l'échantillon

Les données figurant ci-dessous ont été obtenues avec le mélange mère indiqué. Les produits amplifiés des mélanges mères *TCRD* Tube ont été soumis à une analyse d'hétéroduplex et passés dans un gel de polyacrylamide à 6 %.

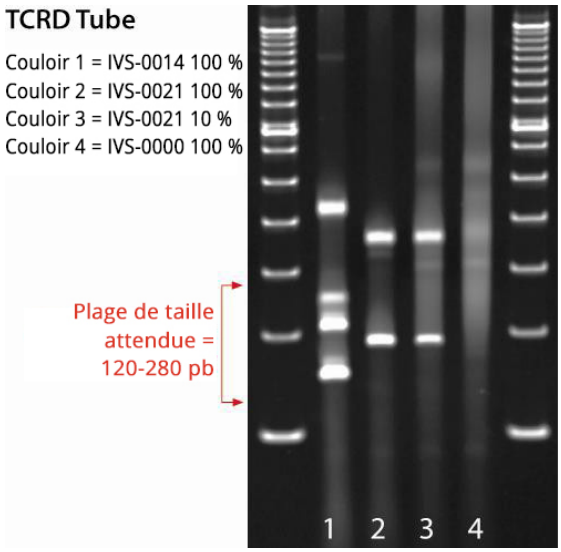

Figure 2. Mélange mère *TCRD* Tube.

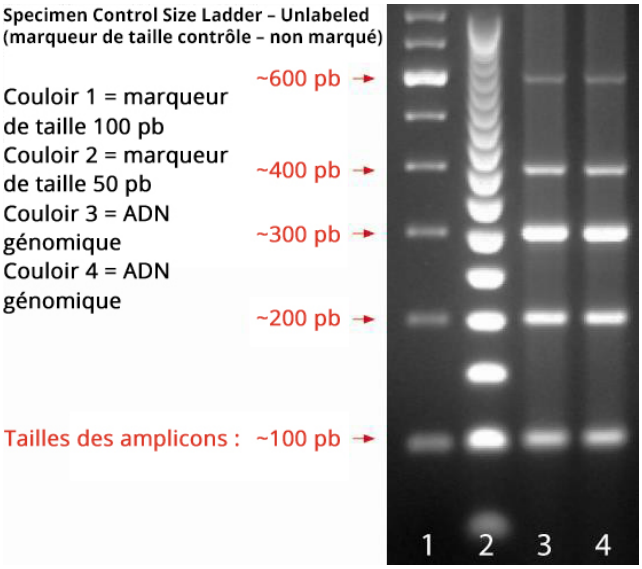

Figure 3. Mélange mère Specimen Control Size Ladder

11. Caractéristiques de performance

Ce test PCR IdentiClone *TCRD* 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 de PCR chez un nombre plus élevé de patients en comparaison avec les résultats de l'analyse SB.[2]

Tableau 9. Études de concordance

Concordance PCR/SB :[2]	
IGH :	sensibilité de 93 % / spécificité de 92 %
IGK :	sensibilité de 90 % / spécificité de 90 %
IGL :	sensibilité de 86 %/spécificité de 92 %
TCRB :	sensibilité de 86 % / spécificité de 98 %
TCRG:	sensibilité de 86 % / spécificité de 94 %
TCRD :	sensibilité de 83 % / spécificité de 95 %

La précision diagnostique de ce test IdentiClone a été déterminée être d'au moins 89 %. L'utilisation des tests IdentiClone n'a généré aucun résultat faux positif évident et le niveau de précision était très élevé. 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.

13. Support technique et service client

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

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

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

Représentant agréé et assistance technique UE
EC REP Invivoscribe Technologies, SARL
Le Forum – Bât B
515 Avenue de la Tramontane
ZI Athélia IV
13600 La Ciotat, France

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.

IVD	Destiné au diagnostic *in vitro*		Date de péremption
REF	Numéro de référence	EC REP	Représentant agréé dans la Communauté européenne
VOL	Volume de réactif		Fabricant
LOT	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®.

©2021 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.