

Instructions d'utilisation



IdentiClone® *TCRD* Gene Clonality Assay

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

IVD Destiné au diagnostic *in vitro*



Conditions de conservation : -85°C à -65°C

(Les ADN de contrôle peuvent être séparés des kits de test et conservés entre 2°C et 8°C)

Réf. catalogue	Produits	Quantité
REF 92060011	IdentiClone <i>TCRD</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 réactions
REF 92060021	IdentiClone <i>TCRD</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	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 par fluorescence différentielle	4
4.	REACTIFS	5
4.1.	Composants des réactifs	5
4.2.	Mises en garde et précautions.....	6
4.3.	Conservation et manipulation	6
5.	INSTRUMENTS.....	7
5.1.	Thermocycleur	7
5.2.	Instruments d'électrophorèse capillaire ABI.....	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 des échantillons	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	11
7.4.	Amplification	12
7.5.	Détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI	12
7.6.	Contrôle qualité	13
7.7.	Contrôles positifs recommandés	13
8.	INTERPRETATION DES RESULTATS	14
8.1.	Analyse	14
8.2.	Interprétation de l'échantillon.....	14
9.	LIMITES DE LA PROCEDURE	15
10.	VALEURS ATTENDUES	15
10.1.	Taille attendue des produits amplifiés	15
10.2.	Données des échantillons	15
11.	CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE	16
12.	BIBLIOGRAPHIE.....	16
13.	SUPPORT TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT.....	17
14.	SYMBOLES.....	17
15.	INFORMATIONS LEGALES.....	18
15.1.	Garantie et responsabilité.....	18
15.2.	Brevets et marques commerciales	18

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 amplification en chaîne par polymérase (PCR) chez les patients chez qui l'on suspecte un syndrome lymphoprolifératif. Le test *TCRD* Gene Clonality Assay peut notamment être utilisé pour :

- Identifier la clonalité chez les patients chez qui l'on suspecte un syndrome lymphoprolifératif
- 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 des gènes des récepteurs d'antigènes ont lieu au cours de l'ontogenèse des lymphocytes B et T. Ces réarrangements de gènes génèrent des produits dont la longueur et la séquence sont 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 antigénique¹. 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 en matière d'analyse de la 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 mix) 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 à l'aide d'analyseurs ABI ne peuvent détecter de manière fiable les populations clonales représentant moins de 1 % de la population totale de lymphocytes. Toujours interpréter les résultats des tests de clonalité moléculaires en tenant compte des données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.

2.2. Résumé

Ce kit d'analyse contient deux (2) mélanges mères. *TCRD* Tube cible les régions de structure ou « framework » au sein des régions variable, de diversité et de jonction du locus de la chaîne delta des récepteurs des lymphocytes T (TCR). Le mélange mère Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille de contrôle des échantillons) cible plusieurs gènes et génère une série de produits d'amplification d'environ 96, 197, 297, 397 et 602 paires de bases (pb) afin de s'assurer que la qualité et la quantité d'ADN de départ sont suffisantes pour produire un résultat valide. 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 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 se trouvent de part et d'autre d'une zone de la région V-J où ont lieu des réarrangements génétiques programmés au cours de 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, lorsqu'aucun ADN lymphocytaire n'est présent, aucun produit n'est détecté. Pour l'ADN provenant d'échantillons contenant une population clonale, le résultat est d'un ou deux produits d'amplification (amplicons) majeurs sur un fond polyclonal réduit.

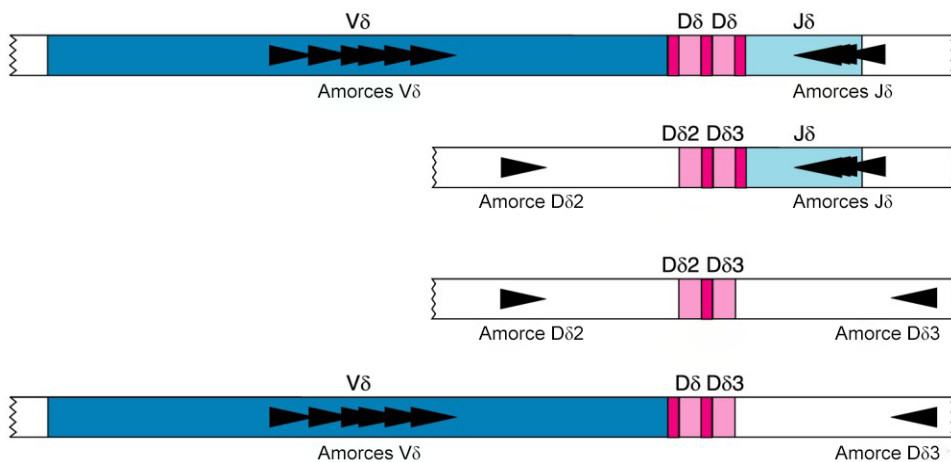


Figure 1. Voici un diagramme simplifié représentant un réarrangement du gène delta des récepteurs des lymphocytes T sur le chromosome 14 (14q11.2) montrant le positionnement approximatif des amorces d'ADN en amont et en aval. Le nombre d'amorces et leur spécificité sont indiqués pour les mélanges mères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

Tube *TCRD* : 6 amorces Vδ et 1 amorce Dδ2 + 4 amorces Jδ et 1 amorce Dδ3

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 sous la forme d'un ou de deux produits majeurs de taille unique sur le fond de produits amplifiés de différentes tailles qui forment une distribution gaussienne autour d'un réarrangement de taille moyenne statistiquement majoritaire.

3.2. Détection par fluorescence différentielle

La détection par fluorescence différentielle est communément employée pour séparer des produits d'amplification de différentes tailles avec un instrument d'électrophorèse capillaire. Les amorces peuvent être conjuguées avec plusieurs marqueurs fluorescents (fluorophores) qui peuvent produire différents spectres d'émission sous l'excitation d'un laser présent dans l'instrument d'électrophorèse capillaire. Différents marqueurs fluorescents peuvent ainsi correspondre à différentes régions ciblées. Cette méthode de détection apporte une sensibilité inégalée, une résolution au nucléotide près, une détection différentielle du produit et une quantification relative. En outre, l'utilisation d'agarose et de gels de polyacrylamide, ainsi que l'utilisation de cancérigènes tels que le bromure d'éthidium, peuvent pratiquement être éliminées. Enfin, la détection différentielle permet une interprétation précise, reproductible et objective des produits spécifiques aux amorces ainsi que l'archivage automatique des données. La reproductibilité inter-test et intra-test dans la détermination de la taille par électrophorèse capillaire est d'environ 1 à 2 nucléotides. Cette reproductibilité et cette sensibilité couplées à l'archivage automatique des données de l'échantillon permettent le suivi, la traçabilité et la comparaison des données du patient dans le temps.

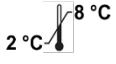
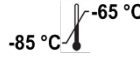
4. Réactifs

4.1. Composants des réactifs

Tableau 1. Kits disponibles

N° de référence	Description	Quantité
REF 92060011	IdentiClone <i>TCRD</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 réactions
REF 92060021	IdentiClone <i>TCRD</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 réactions

Tableau 2. Composants du réactif

Réactif	Référence catalogue (REF)	Composants du réactif (substances actives)	Quantité unitaire	92060011 Nbre d'unités	92060021 Nbre d'unités	Temp. de conservation
Mélanges mères	22060011CE	<i>TCRD</i> Tube – 6FAM et HEX Oligonucléotides multiples ciblant les régions Vδ + Dδ + Jδ du gène delta des récepteurs des lymphocytes T en solution saline tamponnée.	1 500 µL	1	10	
Mélange mère témoin d'amplification	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM (Marqueur de taille contrôle des échantillons) Oligonucléotides multiples ciblant des gènes de ménage.	1 500 µL	1	10	
ADN contrôle positif	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	5	 ou 
ADN contrôle négatif (normal)	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de contrôle polyclonal) 200 µg/mL d'ADN dans une solution TE à 1/10 ^e	100 µL	1	5	

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

4.2. Mises en garde et précautions

- **IVD** Ce produit est destiné au diagnostic *in vitro*.
- Ce kit de test 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 du thermocycleur adéquat, les autres programmes pouvant donner des résultats erronés/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 ainsi que 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 préparer l'ADN des échantillons.
- En raison de la sensibilité analytique de ce test, prendre de très grandes précautions pour éviter de contaminer les réactifs ou les mélanges d'amplification avec des échantillons, des contrôles ou des produits amplifiés. Contrôler attentivement tous les réactifs pour détecter tout signe de contamination (*p. ex.* contrôles négatifs donnant des signaux positifs). Jeter les réactifs suspectés d'être contaminés.
- Afin de 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 une PCR.
- L'autoclavage ne permet pas d'éliminer l'ADN issu d'une contamination. La progression du travail doit se faire dans un seul sens dans le laboratoire de PCR ; commencer par la préparation des mélanges réactionnels, suivie de la préparation des échantillons, puis réaliser l'amplification et terminer par la détection. N'introduire aucun ADN amplifié dans les zones réservées à la préparation des mélanges réactionnels 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 des consommables en plastique stériles et jetables dans la mesure du possible pour éviter toute contamination par des 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 de 2°C à 8°C, mais les ADN contrôles peuvent également être conservés 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 peut endommager l'ADN et faire perdre leurs fluorophores aux amorces marquées.
- 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.
- En raison des concentrations élevées en sels, les mélanges mères de PCR sont sensibles aux cycles de congélation/décongélation. Si nécessaire, aliquoter les mélanges réactionnels dans des tubes à bouchon à visser avec joint torique stériles.

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 d'entretien du fabricant.
- Voir la section 7.4 *Amplification* pour le programme du thermocycleur.

5.2. Instruments d'électrophorèse capillaire ABI

- Utilisation ou fonction : détection et analyse de fragment
- Caractéristiques de performance et spécifications :
 - Les instruments d'électrophorèse capillaire suivants peuvent être utilisés pour ce test :
 - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4-capillaries) [Analyseur génétique ABI 3100 Avant (4 capillaires)]
 - ABI 3100 Genetic Analyzer (16-capillaries) [Analyseur génétique ABI 3100 (16 capillaires)]
 - ABI 3130 Genetic Analyzer (4-capillaries) [Analyseur génétique ABI 3130 (4 capillaires)]
 - ABI 3130xL Genetic Analyzer (16-capillaries) [Analyseur génétique ABI 3130xL (16 capillaires)]
 - ABI 3500 Genetic Analyzer (8-capillaries) [Analyseur génétique ABI 3500 (8 capillaires)]
 - ABI 3500xL Genetic Analyzer (24-capillaries) [Analyseur génétique ABI 3500xL (24 capillaires)]
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.
- L'instrument ABI doit être étalonné avec les Matrix Standards (standards de matrice) adéquats comme indiqué à la section 7.2 *Matériel nécessaire (non fourni)*.
- Utiliser les paramètres par défaut correspondant au type de polymère et de capillaire utilisé.
- Voir la section 7.5 *Détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI* pour la préparation des échantillons.

6. Prélèvement et préparation des échantillons

6.1. Précautions

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

6.2. Substances interférentes

Les substances suivantes peuvent interférer avec la PCR :

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

6.3. Conditions de prélèvement et manipulation

Ce test analyse l'**ADN génomique (ADNg)** 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 (conservé et expédié congelé ou conservé et expédié dans du milieu RPMI 1640 à température ambiante ou sur un lit de glace)
- 2 µg d'ADN génomique (conservé entre 2°C et 8°C et expédié à température ambiante)
- Coupes ou tissus fixés au formol et inclus en paraffine (conservés et expédiés à température ambiante)

6.4. Préparation des échantillons

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 de l'eau purifiée USP. Il s'agit d'un système de test robuste. Une large gamme de concentrations d'ADN générera un résultat valide. Par conséquent, il n'est pas nécessaire en général de quantifier et d'ajuster les concentrations d'ADN. Tester l'ADN des échantillons avec le mélange réactionnel du marqueur de taille Specimen Control Size Ladder assurera qu'un ADN de qualité et en quantité suffisantes était présent pour produire un résultat valide.

6.5. Conservation des échantillons

Conserver l'ADN génomique à une température comprise entre 2°C et 8°C ou entre -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 22060011CE	TCRD Tube – 6FAM et HEX
REF 20960021	Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle des échantillons) – 6FAM
REF 40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA (ADN contrôle clonal IVS-0021)
REF 40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de contrôle polyclonal)

7.2. Matériel nécessaire mais non fourni

Tableau 4 : Matériel nécessaire (non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs/Matériel recommandés et fournisseurs	Référence catalogue REF	Remarques
ADN polymérase	Roche : - ADN polymérase EagleTaq Invivoscribe, Inc. : - ADN polymérase FalconTaq ou équivalent	05206944190 60970130	S.O.
Eau désionisée distillée dans du verre de qualité biologie moléculaire ou eau purifiée (USP)	S.O.	S.O.	Stérile et exempt de DNase et de RNase
Pipettes calibrées	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	Thermo Fisher Scientific : - Thermocycleur Verity Dx Bio-Rad : - MJ Research PTC-100 ou PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer - PE 9600 ou PE 9700	S.O.	S.O.
Agitateur vortex	S.O.	S.O.	S.O.
Plaques ou tubes pour PCR	S.O.	S.O.	Stériles
Pointes de pipette à filtre	S.O.	S.O.	Stériles, exemptes de RNase/DNase/apyrogènes
Microtubes à centrifuger	S.O.	S.O.	Stériles
Instrument d'électrophorèse capillaire ABI	Applied Biosystems : Série ABI 310, 3100 ou 3500 series	S.O.	S.O.
Formamide Hi-Di	Applied Biosystems : Formamide Hi-Di™	4311320	S.O.

Tableau 4 : Matériel nécessaire (non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs/Matériel recommandés et fournisseurs	Référence catalogue (REF)	Remarques
Marqueurs de taille	Invivoscribe, Inc. : • Hi-Di Formamide w/ROX size standards pour ABI 3100	60980061	S.O.
	Applied Biosystems : • Pour les instruments ABI 3100 ou 3130 : o GeneScan™ - 400HD [ROX]™	402985	
	• Pour les instruments ABI 3500 : o GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0	4408399	
Jeux de fluorophores (Dye sets) pour étalonnage spectral	Applied Biosystems : • Pour les instruments ABI 3100 et 3130 : o DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D) (Kit Standard DS-30 Matrix [jeu de fluorophores D])	4345827	S.O.
	• Pour les instruments ABI 310 : o NED Matrix Standard o Et Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX]	402996 401546	
	• Pour les instruments ABI 3500 : o DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) (Kit Standard DS-33 Matrix [jeu de fluorophores G5])	4345833	
Polymère	Applied Biosystems : • Polymère POP-4™ : o POP-4 pour 310 Genetic Analyzers (analyseurs génétiques)	402838	S.O.
	o POP-4 pour 3100/3100-Avant Genetic Analyzers (analyseurs génétiques)	4316355	
	o POP-4 pour 3130/3130xL Genetic Analyzers (analyseurs génétiques)	4352755	
	• Polymère POP-7™ : o POP-7 pour 3130/3130xL Genetic Analyzers (analyseurs génétiques)	4352759	
	o POP-7 pour 3500/3500xL Genetic Analyzers (analyseurs génétiques)	4393714	
Tampon	Applied Biosystems : • 10X Genetic Analyzer Buffer with EDTA tampon 10X pour analyseur génétique avec EDTA)	402824	Diluer au 1/10 ^e dans de l'eau stérile avant utilisation

7.3. Préparation des réactifs

- Tous les échantillons inconnus peuvent être analysés avec le mélange mère Specimen Control Size Ladder afin de garantir 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. Si les tests en double donnent des résultats discordants, l'échantillon doit être retesté ou réévalué.
- Analyser les contrôles positifs, négatifs et sans ADN 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 les 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 de réaction supplémentaire toutes les 15 réactions pour corriger les erreurs de pipetage.
- Ainsi, le nombre de réactions (**n**) pour chaque mélange mère (à l'exception du Specimen Control Size Ladder) doit être :

n = 2 × nbre d'échantillons	(analyser chaque échantillon en double)
+ 1	ADN de contrôle positif (voir la section 7.7 <i>Contrôles positifs recommandés</i>)
+ 1	ADN de contrôle négatif (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	contrôle sans matrice (eau)
+ 1	pour corriger les erreurs de pipetage
n = 2 × nbre d'échantillons + 4	Total

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

m = nbre d'échantillons	(analyser chaque échantillon en double)
+ 1	ADN de contrôle positif (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	contrôle sans matrice (eau)
+ 1	pour corriger les erreurs de pipetage
m = nbre d'échantillons + 3	Total

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

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

- La quantité totale de DNA polymerase Taq ajoutée à chaque mélange mère est égale à **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 de la solution appropriée de mélange réactionnel + ADN polymérase dans les puits individuels d'une plaque pour PCR ou dans des tubes pour PCR.

7.3.5. Ajouter 5 µL de la matrice appropriée (ADN des échantillons, ADN de contrôle positif, ADN de contrôle négatif ou eau) dans les puits individuels contenant les solutions de mélanges mères respectives. Mélanger en aspirant et en refoulant plusieurs fois à l'aide d'une pipette.

7.3.6. Reboucher les tubes ou recouvrir la plaque de PCR.

- Les échantillons sont maintenant prêts à être amplifiés dans un thermocycleur.
- Si l'amplification ne peut pas être réalisée immédiatement après la préparation des réactifs, il est possible de conserver la plaque ou les tubes pour PCR au réfrigérateur entre 2°C et 8°C pendant 24 heures maximum.

Guide pratique :

Pour chaque mélange réactionnel et n réactions, mélanger :

n × 45 µL de mélange mère

n × 0,25 µL d'ADN polymérase Taq

Vortexer doucement pour mélanger.

Aliquoter **45 µL** de solution de mélange réactionnel + ADN polymérase dans chaque puits de réaction

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

Volume total de la réaction = **50 µL**

7.4. Amplification

7.4.1. Amplifier les échantillons en utilisant le programme de 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	Infinie	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 prolongées, les produits de PCR doivent être conservés entre 2°C et 8°C jusqu'à la détection.
- La détection doit être effectuée dans les 30 jours suivant l'amplification.

7.5. Détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI

Veuillez noter que la détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI génère souvent un pic précurseur. Il s'agit d'un artefact dû à la méthode de détection employée par les plateformes ABI. Les pics précurseurs sont parfois incurvés et le côté droit de leurs bases penche vers le pic réel. Cela est particulièrement manifeste pour le mélange mère Specimen Control Size Ladder où le pic des 96 nucléotides comporte un pic précurseur visible à 84 nucléotides.

- Ne pas multiplexer des produits PCR de différents mélanges mères, car cela réduit la sensibilité globale de l'analyse.

Plateformes ABI 310, 3100 OU 3130

- 7.5.1. Dans un microtube à centrifuger non utilisé, mélanger une quantité appropriée (pour un total de 10 µL par réaction) de formamide Hi-Di avec les ROX Size Standards (marqueurs de taille ROX). Bien vortexer.
- 7.5.2. Dans une plaque PCR à 96 puits, ajouter 10 µL de formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille ROX dans les puits individuels pour chaque réaction.
- 7.5.3. Transférer 1 µL de chaque réaction PCR dans les puits contenant le formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille ROX.
 - Ajouter un seul échantillon par puits.
 - Aspirer et expulser avec la pipette pour mélanger.
- 7.5.4. Reboucher ou couvrir la plaque ou les tubes PCR.
- 7.5.5. Dénaturer à la chaleur les échantillons à 95°C pendant 2 minutes, puis réfrigérer brusquement dans de la glace pendant 5 minutes.
- 7.5.6. Préparer une **feuille d'échantillons** et une **liste d'injection** des échantillons.
- 7.5.7. Analyser les échantillons avec l'instrument d'électrophorèse capillaire ABI conformément au manuel d'utilisation.
 - Les données sont automatiquement affichées sous forme de pics de taille et de couleur spécifiques.
- 7.5.8. Passer en revue le profil et les contrôles, puis effectuer un rapport des résultats. (Voir la section 8 : *Interprétation des résultats* et la section 10 : *Valeurs attendues* ci-dessous.)

Plateformes ABI 3500 :

- Remarque :** Compte tenu des écarts de performance d'un instrument à l'autre de la plateforme de la série ABI 3500, les quantités de formamide, d'échantillon et de marqueurs de taille indiquées dans le protocole correspondent à un point de départ. Il peut être nécessaire d'optimiser le protocole pour chaque instrument ABI 3500.
- 7.5.9. Dans un microtube à centrifuger non utilisé, mélanger une quantité appropriée (9,5 µL par réaction) de formamide Hi-Di avec les LIZ Size Standards. Bien vortexer.
 - 7.5.10. Dans une plaque PCR à 96 puits, ajouter 9,5 µL de formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille LIZ dans les puits individuels pour chaque réaction.
 - 7.5.11. Transférer 0,5 µL de chaque réaction dans les puits contenant le formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille LIZ.
 - Ajouter un seul échantillon par puits.
 - Aspirer et expulser avec la pipette pour mélanger.
 - 7.5.12. Reboucher les tubes ou recouvrir la plaque de PCR à l'aide d'un film.
 - 7.5.13. Dénaturer à la chaleur les échantillons à 95°C pendant 3 minutes, puis réfrigérer brusquement sur de la glace pendant 5 minutes.
 - 7.5.14. Préparer une feuille d'échantillons et une liste d'injection pour les échantillons.
 - 7.5.15. Analyser les échantillons avec l'instrument d'électrophorèse capillaire ABI 3500 conformément au manuel d'utilisation.
 - Les données sont automatiquement affichées sous forme de pics de taille et de couleur spécifiques.
 - 7.5.16. Passer en revue le profil et les contrôles, puis effectuer un rapport des résultats. (Voir la section 8 : *Interprétation des résultats* et la section 10 : *Valeurs attendues*).

7.6. Contrôle qualité

Les contrôles positifs et négatifs (ou normaux) sont fournis avec le kit et peuvent être testés en simple à chaque fois que le test est réalisé pour s'assurer que le test fonctionne correctement. 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 due à une technique stérile incorrecte. Un contrôle du tampon peut également être ajouté pour s'assurer que le tampon utilisé pour remettre en suspension les échantillons n'a pas été contaminé. Les valeurs des contrôles positifs sont fournies dans la section 10.1 *Taille attendue des produits d'amplification*. 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 des produits d'amplification indiquées ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI. Les tailles des produits d'amplification visibles sur chaque instrument d'électrophorèse capillaire spécifique peuvent différer de 1 à 4 nucléotides (nt) de celles figurant ci-après selon la plateforme de détection et la version du logiciel d'analyse utilisée. Une fois identifiée, la taille du produit d'amplification déterminée sur chaque instrument sera uniforme d'une analyse à l'autre. Cette reproductibilité est extrêmement utile pour surveiller la récurrence de la maladie.

Remarque : « Couleur » indique la couleur des produits générée avec le mélange mère en utilisant les paramètres de couleur par défaut des systèmes de détection par fluorescence ABI.

Tableau 6 : Contrôles positifs recommandés

Mélange mère	Cible	Couleur	ADN contrôle	N° de référence	Taille du produit en nucléotides (nt)
<i>TCRD</i> Tube	Vδ + Jδ + Dδ	Bleu (Jδ) et Vert (Dδ3)	Plage de taille attendue IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40881210	120 - 280^a 158 (région mineure), 183
Specimen Control Size Ladder	Différents gènes	Bleu	Plage de taille attendue IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397, 602^b 96, 197, 297, 397, 602 ^b

^aRemarque : Un pic de 90 nt peut être observé dans les échantillons normaux (polyclonaux).

^bRemarque : 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 602 nt. Pour la détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI, le pic de 602 nt peut ne pas apparaître au cours des durées de réaction normales. En outre, la taille de ce pic peut différer de 30 nt lorsque la taille du fragment est extrapolée à l'aide des marqueurs de taille GeneScan - 400HD [ROX].

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 pour chaque mélange mère a été déterminée en testant des échantillons de contrôles positifs et négatifs. Pour une interprétation correcte et claire, il est important d'ignorer les bandes situées en dehors de la plage de taille valide pour 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. Tester à nouveau les échantillons qui sont négatifs 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 produisent pas les résultats attendus, le test n'est pas valide et les échantillons ne peuvent pas être interprétés.

Tableau 7 : Le tableau suivant décrit l'analyse de chacun des contrôles ainsi que les décisions qui s'imposent 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 d'amplification</i> . Aucun réarrangement clonal n'est présent. Procéder à l'analyse.	Un réarrangement clonal est présent. 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 d'amplification</i> . Continuer l'analyse.	Répéter le test.
Specimen Control Size Ladder (Ce contrôle de l'amplification est <u>essentiel</u> pour les échantillons dont la qualité et la quantité sont inconnues.)	Si tous les pics de 96, 197, 297, 397 et 602 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 602 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, réévaluer l'échantillon afin de détecter toute dégradation éventuelle 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, interpréter les échantillons cliniques comme suit :

- 8.2.1. Un ou deux pic(s) positif(s) proéminent(s)^a dans la plage de taille attendue sont interprétés comme :
 - « **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 pic(s) positif(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'un pic positif sont les suivants :

- Les produits générés à partir d'**échantillons de diagnostic** dont la taille correspond à la plage de taille attendue et dont l'amplitude est égale à au moins trois fois celle du troisième plus grand pic dans le fond polyclonal correspondent à un pic positif.
- Les produits générés à partir d'**échantillons prélevés après le diagnostic initial** dont la taille correspond à la plage de taille attendue et dont l'amplitude 1) est égale à au moins trois fois celle du troisième plus grand pic ou 2) dépasse les pics voisins adjacents et dont la taille est identique à celle des produits clonaux de produits d'amplification obtenus précédemment du même patient avec l'utilisation du même mélange mère correspondent à un pic positif.

9. Limites de la procédure

- Ce test n'identifie pas 100 % des populations clonales.
- Ce test ne peut pas détecter, de manière fiable, moins d'une (1) cellule positive pour 100 cellules normales.
- Toujours interpréter les résultats des tests de clonalité moléculaires en tenant compte des données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.
- Les tests PCR sont sujets 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 des produits d'amplification indiquées ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI. Les tailles des produits d'amplification visibles sur chaque instrument d'électrophorèse capillaire spécifique peuvent différer de 1 à 4 nucléotides (nt) de celles figurant ci-après selon la plateforme de détection et la version du logiciel d'analyse utilisée. Une fois identifiée, la taille du produit d'amplification déterminée sur chaque plateforme sera uniforme d'une analyse à l'autre. Cette reproductibilité est extrêmement utile pour surveiller la récurrence de la maladie.

Remarque : « Couleur » indique la couleur des produits générée avec le mélange mère en utilisant les paramètres de couleur par défaut des systèmes de détection par fluorescence ABI.

Tableau 8 : Taille attendue des produits d'amplification

Mélange mère	Cible	Couleur	ADN contrôle	N° de référence	Taille du produit en nucléotides (nt)
<i>TCRD</i> Tube	Vδ + Jδ + Dδ	Bleu (Jδ) et Vert (Dδ3)	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, 160 – 280^b
Specimen Control Size Ladder	Différents gènes	Bleu	Plage de taille attendue IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397, 602^c 96, 197, 297, 397, 602 ^c

^aRemarque : Un pic de 90 nt peut être observé dans les échantillons normaux (polyclonaux).

^bRemarque : Un pic non spécifique de 163 nt peut être observé dans les échantillons normaux (polyclonaux).

^cRemarque : 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 602 nt. Pour la détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI, le pic de 602 nt peut ne pas apparaître au cours des durées de réaction normales. En outre, la taille de ce pic peut différer de 30 nt lorsque la taille du fragment est extrapolée à l'aide des marqueurs de taille GeneScan - 400HD [ROX].

10.2. Données des échantillons

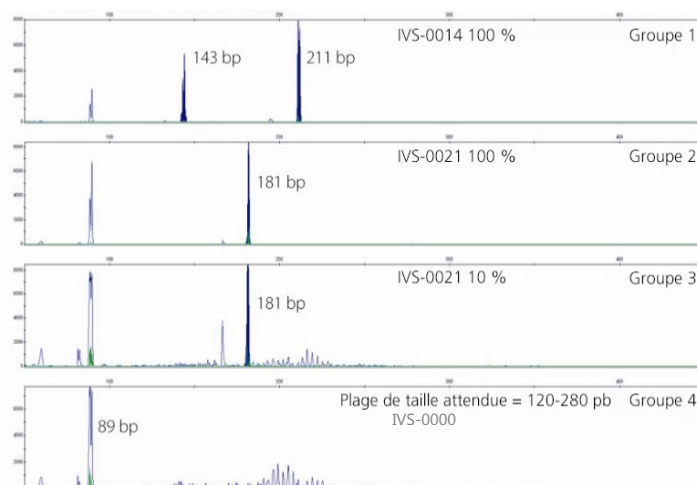


Figure 2. Les données figurant à gauche ont été obtenues avec le mélange mère *TCRD* Tube.

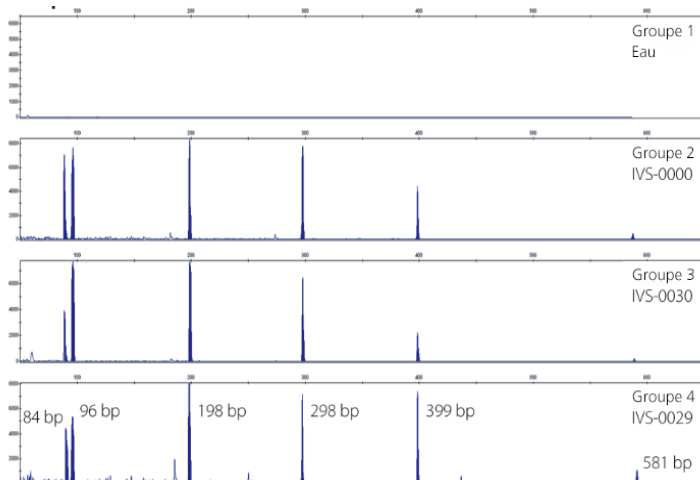


Figure 3. Le mélange mère Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle des échantillons).

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 en bonne corrélation avec les résultats de PCR chez un nombre plus élevé de patients en comparaison avec les résultats obtenus par Southern Blot².

Tableau 9.9 Études de la 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 10. 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 %

La précision diagnostique de ce test IdentiClone a été déterminée comme étant 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. *Molecular Diagnostics*. 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

Coordonnées



Invivoscribe, Inc

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

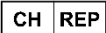
Téléphone: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Heures d'ouverture: 7 h – 17 h heure du Pacifique

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

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

14. Symboles

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

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

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 modes d'emploi, pour les produits comprenant ce type de notices. Si un produit couvert par des spécifications produit ne fonctionne pas comme spécifié, notre politique consiste à remplacer le produit ou à 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 en testant des contrôles positifs, négatifs et sans matrice 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 commerciales

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®.

©2023 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.