

Mode d'emploi

CE IVD

IdentiClone® *BCL1/J_H* Translocation Assay

Destiné à l'identification du lymphome à cellules du manteau et d'autres lymphomes et leucémies

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 93080010	IdentiClone <i>BCL1/J_H</i> Translocation Assay – Gel Detection	33 réactions
REF 93080020	IdentiClone <i>BCL1/J_H</i> Translocation Assay MegaKit – Gel Detection	330 réactions

Table des matières

1.	UTILISATION PREVUE	3
2.	RESUME ET EXPLICATION DU TEST	3
2.1.	Contexte	3
2.1.	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.	Mises en garde et précautions.....	5
4.3.	Conservation et manipulation	6
5.	INSTRUMENTS	6
5.1.	Thermocycleur	6
5.2.	Cuve d'électrophorèse.....	6
5.3.	Transilluminateur UV	6
6.	PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	7
6.1.	Précautions.....	7
6.2.	Substances interférentes.....	7
6.3.	Conditions de prélèvement et manipulation.....	7
6.4.	Préparation des échantillons	7
6.5.	Conservation des échantillons	7
7.	PROCEDURE DE TEST	8
7.1.	Matériel fourni	8
7.2.	Matériel nécessaire (mais non fourni).....	8
7.3.	Préparation des réactifs	9
7.4.	Amplification	10
7.5.	Détection sur gel – Gels d'agarose TBE	10
7.6.	Contrôle qualité	11
7.7.	Contrôles positifs recommandés	11
8.	INTERPRETATION DES RESULTATS	12
8.1.	Analyse	12
8.2.	Interprétation de l'échantillon	12
9.	LIMITES DE LA PROCEDURE	13
10.	VALEURS ATTENDUES	13
10.1.	Taille attendue des produits d'amplification.....	13
10.2.	Données de l'échantillon.....	13
11.	CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE	14
12.	BIBLIOGRAPHIE.....	14
13.	SUPPORT TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT	14
14.	SYMBOLES.....	15
15.	INFORMATIONS LEGALES.....	15
15.1.	Garantie et responsabilité.....	15
15.2.	Brevets et marques commerciales	15
15.3.	Avis à l'acheteur – EagleTaq DNA Polymerase (ADN polymérase EagleTaq) UNIQUEMENT	15

1. Utilisation prévue

Le test IdentiClone *BCL1/J_H* Translocation Assay est un produit de diagnostic *in vitro* destiné à la détection, par amplification en chaîne par polymérase (PCR), des translocations t(11;14)(q13;q32) *BCL1/J_H* chez les patients chez qui l'on suspecte un syndrome lymphoprolifératif et qui peut être utilisé pour :

- Identifier les translocations du gène *BCL1/J_H* suggérant fortement un lymphome à cellules du manteau
- Distinguer le lymphome à cellules du manteau d'autres tumeurs prolifératives à lymphocytes B néoplasiques ou bénignes
- Surveiller et évaluer la récurrence de la maladie

2. Résumé et explication du test

2.1. Contexte

La translocation t(11;14)(q13;q32) du gène *BCL1/J_H* est principalement observée en cas de lymphome à cellules du manteau (LCM) (50 à 70 %), mais est également observée dans la leucémie prolymphocytaire à cellules B (LPL-B) (10 à 20 %), la leucémie à plasmocytes (LP), le lymphome splénique à lymphocytes villeux (LSLV), la leucémie lymphoïde chronique (LLC) (2 à 5 %) et le myélome multiple (MM) (20 à 25 %).¹ L'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) utilisant des sondes de part et d'autre de la région Bcr (breakpoint cluster) de la translocation *BCL1/J_H* sur la bande q13 du chromosome 11 a révélé que tous les lymphomes à cellules du manteau (tels que définis par la classification REAL) sont porteurs de la translocation t(11;14)(q13;q32).^{2,3} Les points de cassure *BCL1/J_H* sont dispersés sur une région de 350 kilobases (kb) et environ 41 % de ces groupes de points de cassure dans un locus de seulement 1 kb sont désignés comme étant la région MTC (Major Translocation Cluster) *BCL1*.³ Les points de cassure *BCL1/J_H* groupés dans le locus *BCL1-MTC* de 1 kb peuvent être détectés par la méthode d'amplification en chaîne par polymérase (PCR).

La translocation génétique aberrante juxtapose les gènes de la région de jonction (*J_H*) de chaîne lourde d'immunoglobuline (*IGH*) sur le chromosome 14q32 et le gène de la cycline D1 sur le chromosome 11q13. La juxtaposition des séquences *IGH J_H* entraîne l'activation transcriptionnelle de la cycline D1, qui est impliquée dans la régulation de la progression G1 et de la transition G1/S du cycle cellulaire.^{4,5} La translocation n'aboutit pas à l'expression d'une protéine de fusion ; en fait, l'oncogenèse est due à un échange promoteur/amplificateur, selon lequel l'amplificateur du gène de l'immunoglobuline stimule l'expression de la cycline D1. La surexpression de la cycline D1, à son tour, accélère le passage des cellules transformées au cours de la phase G1. La classification révisée de l'OMS inclut la présence de la translocation t(11;14)(q13;q32) et/ou de la surexpression de la cycline D1 comme l'une des caractéristiques du lymphome à cellules du manteau.

Ce test est surtout utile en cas de diagnostic différentiel incluant le LCM. Par exemple, une prolifération de lymphocytes B dans les tissus, le sang ou la moelle osseuse qui est difficile à classer comme une LLC, un lymphome folliculaire (LF), un lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses ou un LCM peut facilement correspondre à ce dernier en cas de détection d'une translocation du gène *BCL1/J_H*. Cette caractérisation a des conséquences cliniques importantes, dans la mesure où les lymphomes à cellules du manteau sont généralement plus agressifs et que leur pronostic global est plus défavorable que les autres lymphomes à cellule B de bas grade. Dans la mesure où cette anomalie moléculaire est également un marqueur tumoral spécifique, elle peut être utilisée à des fins de stadification et de surveillance des patients pour détecter tout signe de rechute après traitement, si le lymphome d'origine a été étudié et a présenté un réarrangement du gène *BCL1/J_H*.

2.1. Résumé

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 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). Les tests ont été réalisés dans plus de 30 centres d'analyse majeurs 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).⁶

Les tests basés sur une détection sur gel ne peuvent détecter de manière fiable les populations clonales représentant moins de 0,1 % de la population totale de lymphocytes. **Toujours interpréter les résultats des tests de clonalité moléculaire en tenant compte des données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.**

Ce kit d'analyse contient deux (2) mélanges mères. Le mélange mère *BCL1/J_H* cible le groupe de translocation majeur (MTC) du locus *BCL1* et de la région de jonction du locus de la chaîne lourde d'immunoglobuline. L'autre mélange mère, Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle des échantillons), cible plusieurs gènes et génère une série de produits d'amplification

d'environ 100, 200, 300, 400 et 600 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. La procédure utilise un seul programme du thermocycleur et des méthodes de détection similaires pour de nombreux tests Invivoscribe, ce qui améliore la cohérence et facilite l'apprentissage croisé d'une large gamme de tests.

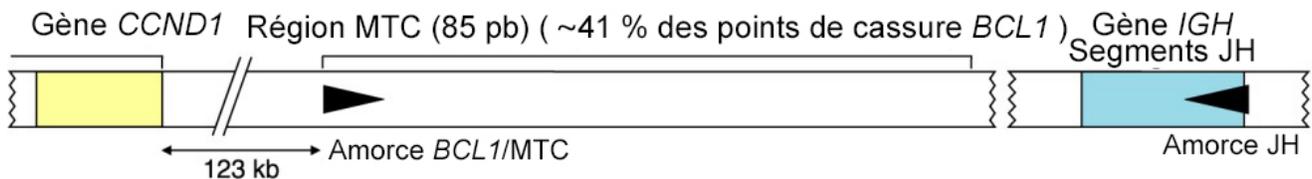
Ce test est basé sur EuroClonality/BIOMED-2 Concerted Action
(Action Concertée EuroClonality/BIOMED-2) BMH4-CT98-3936.



3. Principes de la procédure

3.1. Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Les tests PCR sont systématiquement utilisés pour l'identification des translocations chromosomiques. Ce test cible la région MTC de la translocation *BCL1/JH* et amplifie l'ADN génomique situé entre des amorces ciblant le gène *BCL1* et les régions de jonction (*JH*) du gène *IGH* (tube étiqueté *BCL1/JH* Tube master mix [mélange mère Tube *BCL1/JH*]). **Les points de cassure localisés à l'extérieur de la région MTC ne seront pas identifiés avec ce test.** Par conséquent, l'obtention d'un résultat négatif n'exclut pas complètement la présence d'un réarrangement des gènes *BCL1/JH* dans l'échantillon⁶. L'ADN d'une population normale de lymphocytes produira également un résultat négatif.



Tube t(11;14) : 1 amorce *BCL1* MTC + 1 amorce *JH*

Figure 1. Représentation simplifiée de la translocation t(11;14) *BCL1/JH* montrant le gène de la cycline D1 (*CCND1*) à gauche et le gène de la chaîne lourde des immunoglobulines (*IGH*) à droite. On peut voir les positions relatives et les orientations de l'amorce *BCL1/MTC* et de l'amorce *JH*, qui sont incluses dans le mélange mère *BCL1/JH* Tube.

3.2. Détection sur gel

L'électrophorèse sur gel, comme par exemple l'électrophorèse sur gel d'agarose ou l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) non dénaturant, est couramment employée pour séparer les différents produits d'amplification (amplicons) 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 plus petits fragments d'ADN migrent facilement dans la matrice du gel, alors que les fragments d'ADN 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 agents intercalants de l'ADN peuvent ensuite être utilisés pour colorer et détecter ces produits dans le gel.

4. Réactifs

4.1. Composants des réactifs

Tableau 1 : Tests disponibles

Référence catalogue	Description	Quantité
REF 93080010	IdentiClone <i>BCL1/JH</i> Translocation Assay – Gel Detection	33 réactions
REF 93080020	IdentiClone <i>BCL1/JH</i> Translocation Assay MegaKit – Gel Detection	330 réactions

Tableau 2 : Composition du kit

Réactif	Référence catalogue REF	Composants des réactifs (substances actives)	Quantité unitaire	93080010 Nbre d'unités	93080020 Nbre d'unités	Temp. de conservation
Mélange mère	21010010CE	<i>BCL1/JH</i> Tube – Unlabeled (tube <i>BCL1/JH</i> – non marqué) Différents oligonucléotides ciblant la région MTC du gène <i>BCL1</i> et la région J du gène <i>IGH</i> dans une solution saline tamponnée.	1 500 µL	1	10	-85 °C  -65 °C
Mélange mère de contrôle de l'amplification de la matrice	20960020	Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (marqueur de taille contrôle des échantillons – non marqué) Différents oligonucléotides ciblant des gènes de ménage.	1 500 µL	1	10	
ADN de contrôle positif	40880550	IVS-0010 Clonal Control DNA (ADN de contrôle clonal) 200 µg/mL d'ADN dans une solution TE au 1/10 ^e	100 µL	1	5	2 °C  8 °C
ADN contrôle négatif (normal)	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de contrôle polyclonal) 200 µg/mL d'ADN dans une solution TE au 1/10 ^e	100 µL	1	5	ou -85 °C  -65 °C

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

4.2. Mises en garde et précautions

- **IVD 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 biologique 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 d'amplification. 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 mères, 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 mères 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 de 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 mères dans des tubes à bouchon à visser avec joint torique stériles.

5. Instruments

5.1. Thermocycleur

- Utilisation ou fonction : amplification des 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, de calibration et de maintenance du fabricant.
- Voir la section 7.4 : *Amplification* pour le programme du thermocycleur.

5.2. Cuve d'électrophorèse

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

5.3. Transilluminateur UV

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

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 de tissu (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'ADN génomique des échantillons de patients dès que possible. Remettre l'ADN en suspension à une concentration finale comprise entre 100 µg et 400 µg par mL dans de la solution Tris-EDTA (Tris-HCl à 1 mM, pH 8,0 ; EDTA à 0,1 mM) au 1/10^e ou dans de l'eau de qualité 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 mère 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 23080010CE	<i>BCL1/JH</i> Tube – Unlabeled (tube <i>BCL1/JH</i> – non marqué)
REF 20960020	Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (marqueur de taille contrôle des échantillons – non marqué)
REF 40880550	IVS-0010 Clonal Control DNA (ADN de contrôle clonal)
REF 40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de contrôle polyclonal)

7.2. Matériel nécessaire (mais non fourni)

Tableau 4 : Matériel nécessaire (mais non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs/Matériel recommandés et fournisseurs	N° de référence	Remarques
ADN polymérase	Roche : <ul style="list-style-type: none"> ADN polymérase EagleTaq 	05206944190	S.O.
	Invivoscribe, Inc. : <ul style="list-style-type: none"> ADN polymérase EagleTaq¹ ou équivalent 	60970100	
Eau désionisée distillée dans du verre de qualité biologie moléculaire ou eau purifiée (USP)	S.O.	S.O.	Stérile et exempte de DNase et de RNase
Pipettes calibrées	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	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Thermocycleur Verity Dx Bio-Rad : <ul style="list-style-type: none"> MJ Research PTC-100 ou PTC-200, PTC-220, PTC-240 	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
Cuve d'électrophorèse sur gel	S.O.	S.O.	Pour les gels d'agarose
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.
Agarose	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> MetaPhor™ Agarose NuSieve™ 3:1 Agarose 	50180 50090	S.O.
Tampon de migration TBE	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Tampon de migration TBE (5X) Novex 	LC6675	Diluer au 1/5 ^e avant utilisation
Tampon de charge du gel	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Tampon de charge pour gel BlueJuice™ 10X Tampon d'échantillon TBE (5X) haute densité Novex 	10816-015 LC6678	S.O.

Tableau 4 : Matériel nécessaire (mais non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs/Matériel recommandés et fournisseurs	N° de référence	Remarques
Marqueur de taille d'ADN de 100 pb	Thermo Fisher Scientific : • Échelle d'ADN TrackIt™ 100 pb	10488-058	S.O.

¹Remarque : 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. Consulter également les informations légales à la section 15.

7.3. Préparation des réactifs

- Tester tous les échantillons inconnus avec le mélange mère du marqueur de taille Specimen Control Size Ladder afin de s'assurer qu'aucun inhibiteur de l'amplification n'est présent et que l'ADN est de qualité et en quantité suffisantes pour produire un résultat valide.
- Un seul résultat par échantillon est acceptable ; cependant, il est recommandé de **dupliquer** chaque échantillon dans la mesure du possible. Si les tests en double donnent des résultats discordants, il peut être nécessaire de réanalyser ou réévaluer l'échantillon.
- **Analyser les contrôles positifs, négatifs** et sans matrice pour chaque mélange mère.

7.3.1. Mettre des gants et sortir 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 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 × 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 **est n × 45 µL**.
- Pour le mélange mère du marqueur de taille Specimen Control Size Ladder le nombre de réactions (**m**) doit être :

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'aliquot total pour le mélange mère du marqueur de taille Specimen Control Size Ladder est égal à **m × 45 µL**.

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

- La quantité totale de Taq ADN polymérase ajoutée à chaque mélange mère est égale à **n × 0,25 µL**, et à **m × 0,25 µL** pour le mélange mère du marqueur de taille Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle des échantillons).
- Vortexer doucement pour mélanger.

7.3.4. Pour chaque réaction, aliquoter 45 µL de la solution appropriée de mélange mère + 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 et 8 °C pendant 24 heures maximum.

Guide pratique :

Pour chaque mélange mère et n réactions, mélanger :

- $n \times 45 \mu\text{L}$ de mélange mère
- $n \times 0,25 \mu\text{L}$ de Taq ADN polymérase

Vortexer doucement pour mélanger.

Aliquoter **45 μL** de solution de mélange mère + 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 sur gel – Gels d'agarose TBE

7.5.1. Préparer un gel d'agarose MetaPhor à 2 % ou un gel d'agarose NuSieve 3:1 avec du tampon TBE 1X.

7.5.2. Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse et recouvrir de tampon TBE 1X.

7.5.3. Mélanger 20 μL de chaque produit de PCR avec 4 μL de tampon de charge du gel 6X.

7.5.4. Déposer 20 μL de ce mélange dans des puits séparés du gel, puis déposer 4 μL du marqueur de taille d'ADN de 100 pb de part et d'autre des échantillons.

7.5.5. Faire migrer à 100 V pendant 90 minutes.

- La tension et la durée de l'électrophorèse dépendent de la taille des amplicons de PCR, de la longueur du gel et du pourcentage d'agarose dans le gel.
- La tension et le temps de migration peuvent être ajustés en conséquence.

7.5.6. Colorer le gel avec du bromure d'éthidium ou un autre colorant équivalent.

7.5.7. Placer le gel sur un transilluminateur UV pour visualiser les bandes.

7.5.8. Photographier et interpréter les 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 sans matrice (*p. ex.* de l'eau) pour tester la contamination du mélange mère ou la contamination croisée des réactions PCR. 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 amplicons indiquées ont été déterminées par électrophorèse sur gel ou en utilisant une plateforme ABI.

Tableau 6 : Contrôles positifs recommandés

Mélange mère	Cible	ADN de contrôle	N° de référence	Taille du produit en paires de bases (pb)
<i>BCL1/J_H</i> Tube	MTC de <i>BCL1/J_H</i>	Plage de taille attendue IVS-0010 Clonal Control DNA (ADN de contrôle clonal)	--- 40880550	150 – 2 000^a 202, ~600 ^b
Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle des échantillons)	Différents gènes	Plage de taille valide IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de contrôle polyclonal)	--- 40920010	100, 200, 300, 400, 600^c 100, 200, 300, 400, 600 ^c

^aRemarque : Dans des conditions sous-optimales, une bande faible et non spécifique peut être observée à ~550 pb. Afin de différencier un produit spécifique d'un produit non spécifique, vérifier que le contrôle négatif ne génère pas cette bande. Si celle-ci est présente dans le contrôle négatif, le produit est non spécifique.

^bRemarque : Le produit PCR d'environ 600 pb est un produit non spécifique

^cRemarque : 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 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 répétition du test comme suit : « **Aucun résultat ne peut être rendu pour cet échantillon car l'ADN était de qualité ou en quantité insuffisante pour l'analyse** ».
- 8.1.2. Les échantillons pour lesquels l'analyse est négative doivent être répétés 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 6 : 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 en accord avec la taille attendue indiquée à 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 obtenu selon une procédure d'extraction.)	La taille du produit est en accord avec la taille attendue indiquée à la section 10.1: <i>Taille attendue des produits d'amplification</i> . Procéder à l'analyse.	Répéter le test.
Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille de contrôle des échantillons) (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 100, 200, 300, 400 et 600 pb sont observés, continuer l'analyse. Dans la mesure où les plus petits fragments de PCR sont amplifiés de manière préférentielle, il n'est pas rare que le signal du fragment de 600 pb soit diminué ou complètement absent. Procéder à 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, les échantillons cliniques doivent être interprétés comme suit :

- 8.2.1. La présence d'une ou de plusieurs bandes positives^a de forte intensité dans la plage de taille valide est interprétée comme suit :
 - « **Positif pour la détection d'une translocation t(11;14) *BCL1/JH*, indicatif de la présence d'une population cellulaire clonale. En prenant en compte l'ensemble des critères de diagnostic, des 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 d'une translocation t(11;14) *BCL1/JH*** ».

^a**Remarque :** les critères de définition d'une bande positive sont les suivants :

- Les produits issus des échantillons figurant dans la plage de taille valide et produisant une ou plusieurs bandes séparées distinctes correspondent à des bandes positives.

9. Limites de la procédure

- Ce test n'identifie pas 100 % des populations cellulaires clonales.
- Ce test ne peut pas détecter, de manière fiable, moins d'une (1) cellule positive pour 1 000 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 d'amplification

- Les tailles des produits d'amplification indiquées ont été déterminées par électrophorèse sur gel ou en utilisant une plateforme ABI.

Tableau 6 : Taille attendue des produits amplifiés

Mélange mère	Cible	ADN de contrôle	N° de référence	Taille du produit en paires de bases (pb)
<i>BCL1/J_H</i> Tube	MTC de <i>BCL1/J_H</i>	Plage de taille attendue IVS-0030 Clonal Control DNA (ADN de contrôle clonal)	---	150 – 2 000^a 202, ~600 ^b
Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle des échantillons)	Différents gènes	Plage de taille valide IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de contrôle polyclonal)	---	100, 200, 300, 400, 600^c 100, 200, 300, 400, 600 ^c

^aRemarque : Dans des conditions sous-optimales, une bande faible et non spécifique peut être observée à ~550 pb. Afin de différencier un produit spécifique d'un produit non spécifique, vérifier que le contrôle négatif ne génère pas cette bande. Si celle-ci est présente dans le contrôle négatif, le produit est non spécifique.

^bRemarque : Le produit PCR d'environ 600 pb est un produit non spécifique

^cRemarque : 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 d'amplification ont migré dans un gel d'agarose à 2 %.

Tube *BCL1/J_H*

Couloir 1 = IVS-0010 100 %
Couloir 2 = IVS-0010 10 %
Couloir 3 = IVS-0010 1 %
Couloir 4 = IVS-0010 0,1 %
Couloir 5 = IVS-0000 100 %

Plage de
taille attendue =
150-2 000 pb

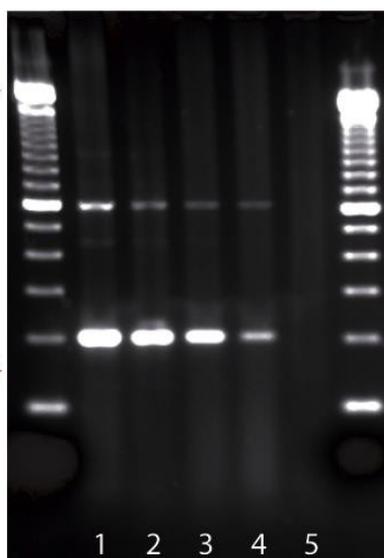


Figure 2. Mélange mère *BCL1/J_H* Tube (tube *BCL1/J_H*)

Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (marqueur de taille contrôle - non marqué)

Couloir 1 = marqueur de taille 100 pb
Couloir 2 = marqueur de taille 50 pb
Couloir 3 = ADN génomique
Couloir 4 = ADN génomique

Tailles des amplicons : ~100 pb

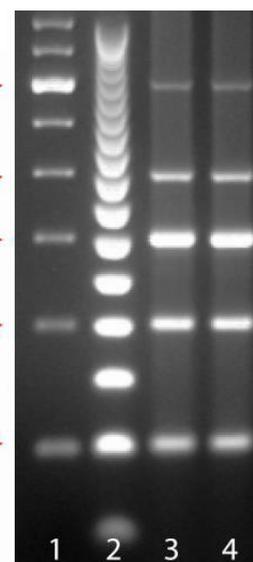


Figure 3. Mélange mère Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle des échantillons).

11. Caractéristiques de performance

La performance analytique du test IdentiClone *BCL1/J_H* Translocation Assay - Gel Detection été évaluée en analysant l'ajout d'ADN de lignée de cellules de lymphome à cellules du manteau (LCM) positives à *BCL1/J_H* à différentes dilutions dans l'ADN d'amygdale. La limite de détection (LD) était observée avec la dilution de l'ADN à 0,1 %. Pour évaluer la précision intra-laboratoire, la concordance totale des résultats a été observée pour quatre analyses effectuées par deux opérateurs sur deux jours.

Le test IdentiClone *BCL1/J_H* Translocation a été conçu par le groupe EuroClonality dans le cadre de l'action concertée du groupe BIOMED-2. Les études relatives à la conception du test, menées dans trois laboratoires en utilisant 25 échantillons provenant de patients atteints de LCM avec translocations *BCL1/J_H* et 18 échantillons négatifs, ont montré une concordance de 100 % des échantillons positifs (25 échantillons sur 25) avec la détection par fluorescence et de 88 % (22 échantillons sur 25) avec la détection sur gel. Pour les échantillons négatifs, la concordance était de 100 % à la fois avec la détection sur gel (18 échantillons sur 18) et la détection par fluorescence (18 échantillons sur 18). La spécificité des deux méthodes de test était de 100 % et il a été déterminé que la sensibilité était comprise entre 10^{-3} et 10^{-4} . La sensibilité est suffisamment élevée pour la détection du point de cassure *BCL1/J_H* dans le matériel diagnostique. Toutefois, seuls 40 à 50 % des points de cassure de la translocation t(11;14) dans la région LCM seront détectés par PCR seule et il est recommandé d'utiliser une méthode de détection supplémentaire pour le diagnostic des points de cassure n'étant pas situés dans la région du groupe de translocation majeur (MCT)⁶.

12. Bibliographie

1. Huret, JL. t(11;14)(q13;q32). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* May 1998.
2. Coignet, LJA *et al.* Detection of 11q13 rearrangements in hematologic neoplasias by double color Fluorescence *In Situ* Hybridization. *Blood* 1996, **87**:1512-1519.
3. Vaandrager, J *et al.* Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood* 1996, **88**:1177-1182.
4. De Boer, CJ *et al.* Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. *Oncogene* 1995, **10**:1833-1840.
5. De Boer, CJ *et al.* Cyclin D1 protein overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. *Blood* 1995, **86**:2715-2723.
6. 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
Support technique : support@invivoscribe.com
Service client : sales@invivoscribe.com
Site Internet : www.invivoscribe.com
Heures d'ouverture : 7 h à 17 h heure du Pacifique

Représentant agréé et assistance technique au sein de l'Union européenne

 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.

	Destiné au diagnostic <i>in vitro</i>		Date de péremption
	Référence catalogue		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 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®.

©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 est interdit de revendre ce produit ou de le transférer 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, CA 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, États-Unis.