

Notice d'Utilisation

**IdentiClone® TCRB + TCRG T-cell Clonality Assay**

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

IVD Destiné au diagnostic *in vitro*



 Conditions de Conservation: **-85°C to -65°C**

(Les ADN contrôles peuvent être séparés des kits d'analyses et conservés entre 2°C et 8°C)

Catalogue N°	Produits	Quantité
REF 9200011	IdentiClone TCRB + TCRG T-cell Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Réactions
REF 9200021	IdentiClone TCRB + TCRG T-cell Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Réactions

Table des matières

1.	UTILISATION PRÉVUE	3
2.	RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST	3
2.1.	Résumé	3
2.2.	Contexte.....	3
3.	PRINCIPES DE LA PROCÉDURE.....	4
3.1.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	4
3.2.	Détection par fluorescence différentielle	5
4.	RÉACTIFS.....	5
4.1.	Composants	5
4.2.	Avertissements et précautions	6
4.3.	Conservation et manipulation.....	6
5.	INSTRUMENTS	7
5.1.	Thermocycleur	7
5.2.	Instruments à électrophorèse capillaire ABI.....	7
6.	PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS.....	8
6.1.	Précautions	8
6.2.	Substances interférentes	8
6.3.	Conditions de prélèvement et manipulation	8
6.4.	Préparation de l'échantillon.....	8
6.5.	Conservation des échantillons	8
7.	PROCÉDURE DE TEST	9
7.1.	Matériel fourni.....	9
7.2.	Matériel nécessaire (non fourni)	9
7.3.	Préparation des réactifs.....	10
7.4.	Amplification.....	11
7.5.	Détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI.....	12
7.6.	Contrôle qualité	12
7.7.	Contrôles positifs recommandés	13
8.	INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.....	13
8.1.	Analyse.....	13
8.2.	Interprétation de l'échantillon.....	14
9.	LIMITES DE LA PROCÉDURE.....	14
10.	VALEURS ATTENDUES.....	15
10.1.	Taille attendue des produits amplifiés.....	15
10.2.	Données de l'échantillon.....	16
11.	CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	17
12.	SERVICE TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT.....	17
13.	BIBLIOGRAPHIE	17
14.	SYMBOLES	18
15.	INFORMATIONS LÉGALES.....	18
15.1.	Garantie et responsabilité.....	18
15.2.	Brevets et Marques	18

1. Utilisation prévue

Le test IdentiClone *TCRB + TCRG* T-cell Clonality Assay est un produit de diagnostic *in vitro* destiné à la détection des réarrangements clonaux du gène de chaîne bêta et de chaîne gamma des récepteurs des lymphocytes T par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) chez les patients suspectés d'être atteints de syndromes lymphoprolifératifs. Le test *TCRB + TCRG* T-cell Clonality Assay peut notamment être utilisé pour :

- Identifier la clonalité chez les patients suspectés d'être atteints de syndromes lymphoprolifératifs
- Étayer un diagnostic différentiel entre des lésions réactives et des tumeurs malignes des lymphocytes T et certaines tumeurs malignes immatures des lymphocytes B
- Déterminer l'implication de la lignée dans les syndromes lymphoprolifératifs matures
- Surveiller et évaluer la récurrence de la maladie

2. Résumé et explication du test

2.1. Résumé

Les réarrangements de gènes du récepteur antigénique se produisent pendant l'ontogenèse des lymphocytes B et T. Ces réarrangements de gènes génèrent des produits de longueur et de séquence uniques pour chaque cellule. Ainsi, les analyses 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 les loci du gène du récepteur antigénique.¹ Ce test IdentiClone PCR utilise différentes amorces ADN consensus ciblant les régions conservées des gènes de la chaîne bêta et de la chaîne gamma 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.

L'analyse des réarrangements de gènes peut également être réalisée par des techniques basées sur le Southern Blot (SB). Bien que l'analyse SB soit très fiable, elle est de plus en plus remplacée par des techniques PCR en raison de leur plus grande efficacité et sensibilité. En outre, la PCR est relativement facile à mettre en œuvre et nécessite moins de préparation et des quantités d'ADN de haut poids moléculaire beaucoup plus réduites que les tests SB. De plus, la PCR peut souvent être réalisée sur de l'ADN extrait de tissus inclus en paraffine, alors que le SB ne peut être utilisé car l'ADN est souvent dégradé. C'est pourquoi il est nécessaire de remplacer l'analyse SB par des techniques PCR fiables.

2.2. Contexte

Les tests d'IdentiClone 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 avec des mélanges mères (master mix) de multiplexes. 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 30 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). Les résultats de cette étude BIOMED-2 ont été publiés dans *Leukemia*, revue renommée avec comité de lecture.² D'après un article paru dans *Leukemia* en 2007, l'analyse conjointe des réarrangements de gènes *TCRB* et *TCRG* conduit à une sensibilité de 94 %, par rapport à 91 % pour *TCRB* et 89 % pour *TCRG* analysés seuls. Elle pourrait aussi améliorer la fiabilité des analyses dans la mesure où il est plus probable que les produits clonaux soient détectés dans plusieurs tubes.⁴

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. Il convient de souligner que les résultats des tests de clonalité moléculaire doivent toujours être interprétés dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.

Ce kit d'analyse contient 6 mélanges mères (master mixes). Les mélanges mères (master mixes) *TCRB* Tube A et B ciblent les régions de la structure ou « framework » au sein de la région variable, ainsi que la région de jonction du locus de la chaîne bêta des récepteurs des lymphocytes T (TCR). *TCRB* Tube C cible les régions de diversité et de jonction du locus de la chaîne bêta des TCR. *TCRG* Tube A contient des amorces qui ciblent les gènes $V\gamma 1-8 + V\gamma 10$ et les gènes $J\gamma 1,1, J\gamma 1,3, J\gamma 2,1$ et $J\gamma 2,3$ (également appelés $J\gamma P1, J\gamma 1, J\gamma P2$ et $J\gamma 2$ respectivement). *TCRG* Tube B contient des amorces qui ciblent les gènes $V\gamma 9 + V\gamma 11$ et les gènes $J\gamma 1,1, J\gamma 1,3, J\gamma 2,1$ et $J\gamma 2,3$. Enfin, le mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder cible plusieurs gènes et génère une série d'amplicons d'environ 96, 197, 297, 397 et 602 paires de bases afin de garantir que la qualité et la quantité d'ADN introduit soient suffisantes à l'obtention d'un résultat fiable. Un seul programme de thermocycleur et des méthodologies de détection similaires

sont utilisés pour tous nos tests de clonalité génique. Cela améliore la cohérence et facilite l'apprentissage croisé d'une large gamme de tests différents.

Ce test est basé sur l'action concertée de l'EuroClonality/BIOMED-2 BMH4-CT98-3936.



3. Principes de la procédure

3.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les analyses PCR sont utilisées en routine pour l'identification de populations clonales de lymphocytes T. Ces tests amplifient l'ADN entre les amorces qui ciblent les régions variables (V) conservées et les régions de jonction (J) conservées (*TCRB* Tube A-B et *TCRG* Tube A et B), ainsi que les régions de diversité (D) et de jonction (*TCRB* Tube C). Ces régions conservées s'étendent de part et d'autre d'une zone de la région V-J marquée par des réarrangements génétiques programmés durant la maturation de tous les lymphocytes B et T. Les gènes du récepteur antigénique qui subissent un réarrangement sont ceux des chaînes lourdes et des chaînes légères 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 obtenue dans la plage de taille attendue. Cette distribution gaussienne reflète la population hétérogène des réarrangements V-J. (Dans certains cas, en l'absence d'ADN de lymphocyte, aucun produit n'est visible). Pour l'ADN provenant d'échantillons contenant une population clonale, le résultat est de un ou deux produits amplifiés (amplicons) majeurs sur un fond polyclonal réduit.

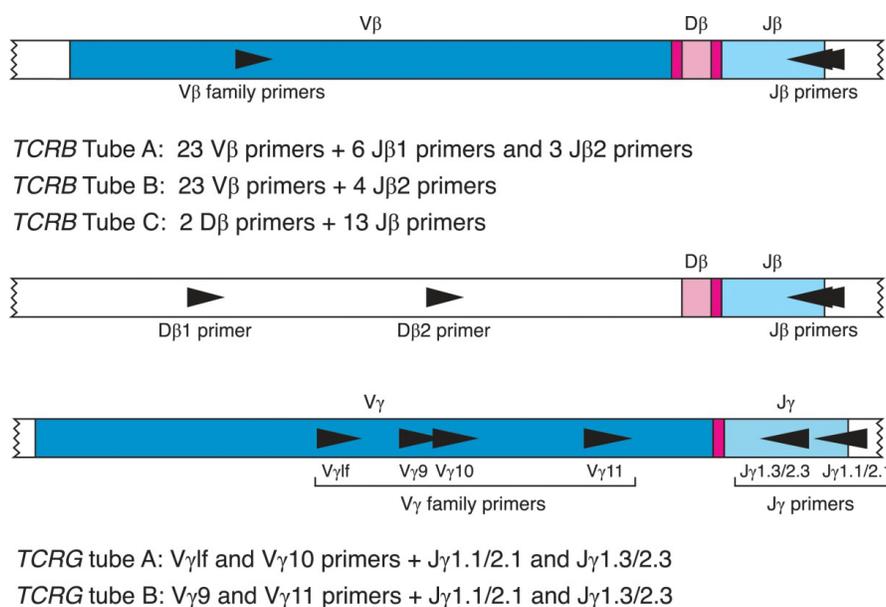


Figure 1. Diagramme simplifié représentant un réarrangement du gène bêta des récepteurs des lymphocytes T et du gène gamma des récepteurs des lymphocytes T montrant le positionnement approximatif des amorces d'ADN en amont et en aval. Le nombre d'amorces et leur spécificité sont cités pour les mélanges mères (master mixes) *TCRB* Tube A, B et C et *TCRG* Tube A et B. (L'amorce V γ 1f est une amorce consensus qui cible V γ 1 à V γ 8).

Les gènes des récepteurs antigéniques étant polymorphiques (composés d'une population hétérogène de séquences ADN apparentées), il est difficile d'utiliser un seul jeu de séquences ADN amorces pour cibler toutes les régions flanquantes conservées autour du réarrangement V-J. La diversité de la région N et les mutations somatiques modifient encore plus les séquences d'ADN de ces régions. Ainsi, les mélanges mères (master mix) de multiplexes ciblant plusieurs régions FR sont nécessaires à l'identification de la majorité des réarrangements clonaux. Comme indiqué, les réarrangements clonaux sont identifiés comme des produits de taille unique prédominants sur le fond des produits d'amplification de tailles variables qui forment une distribution gaussienne autour d'une taille moyenne d'un réarrangement statistiquement majoritaire.

3.2. Détection par fluorescence différentielle

La détection par fluorescence différentielle est couramment employée pour séparer les produits d'amplification de différentes tailles avec un instrument à 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 à 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 d'oncogènes 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-analyse et intra-analyse dans la détermination de la taille par électrophorèse capillaire est d'environ 1 à 2 paire de base. 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 au fil du temps.

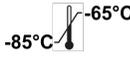
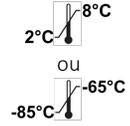
4. Réactifs

4.1. Composants

Tableau 1. Kits disponibles

Catalogue N°	Produits	Quantité
REF 92000011	IdentiClone <i>TCRB</i> + <i>TCRG</i> T-cell Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 réactions
REF 92000021	IdentiClone <i>TCRB</i> + <i>TCRG</i> T-cell Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 réactions

Tableau 2. Composition des Réactifs

Réactif	Catalogue N°	Composants des Réactifs (ingrédients actifs)	Quantité unitaire	92050011 Nb d'Unités	92050021 Nb d'Unités	Temp. de Conservation
Mélanges mères	22050011CE	<i>TCRB</i> Tube A – 6FAM & HEX Oligonucléotides multiples ciblant les régions Vβ + Jβ1 + Jβ2 du gène de chaîne bêta de récepteur de cellules T en solution saline tamponnée.	1500 µL	1	10	
	22050021CE	<i>TCRB</i> Tube B – 6FAM Oligonucléotides multiples ciblant les régions Vβ + Jβ2 du gène de chaîne bêta de récepteur de cellules T en solution saline tamponnée.	1500 µL	1	10	
	22050031CE	<i>TCRB</i> Tube C – 6FAM & HEX Oligonucléotides multiples ciblant les régions Dβ + Jβ1 + Jβ2 du gène de chaîne bêta de récepteur de cellules T en solution saline tamponnée.	1500 µL	1	10	
	22070021CE	<i>TCRG</i> Tube A – 6FAM & HEX Oligonucléotides multiples ciblant les régions Vγ1-8, Vγ10—différentes régions Jγ du gène bêta des récepteurs des lymphocytes T en solution saline tamponnée.	1500 µL	1	10	
	22070041CE	<i>TCRB</i> Tube C – 6FAM & HEX Oligonucléotides multiples ciblant les régions Vγ9, Vγ11 + différentes régions Jγ du gène bêta des récepteurs des lymphocytes T en solution saline tamponnée.	1500 µL	1	10	
Master Mix Témoin d'Amplification	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM Oligonucléotides multiples ciblant des gènes domestiques.	1500 µL	1	10	
Témoins ADNs Positifs	40880490	IVS-0009 Clonal Control DNA 200 µg/mL d'ADN en solution à 1/10 ^{ème} TE	100 µL	1	5	
	40880190	IVS-0004 Clonal Control DNA 200 µg/mL d'ADN en solution à 1/10 ^{ème} TE	100 µL	1	5	
	40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA 200 µg/mL of DNA in 1/10 ^{ème} TE solution	100 µL	1	5	
Témoin ADN Négatif (Normal)	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA 200 µg/mL d'ADN en solution à 1/10 ^{ème} TE	100 µL	1	5	

Remarque : Aucun conservateur n'est utilisé dans la fabrication de ces kits.

4.2. Avertissements et précautions

- **IVD** Ce produit est destiné au diagnostic *in vitro*
- Le kit d'analyse 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 matériels sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.
- Le strict respect du protocole garantit une performance optimale et une bonne reproductibilité. Il convient de veiller à utiliser le programme de thermocycleur adéquat, les autres programmes pouvant donner des résultats imprécis/faussés, comme des faux positifs et des faux négatifs.
- Ne pas mélanger ou combiner les réactifs de kits comportant des numéros de lots différents.
- Le personnel de laboratoire doit porter un équipement de protection individuelle (EPI) approprié et suivre les bonnes pratiques de laboratoire et les précautions universelles lors de la manipulation des échantillons. Les échantillons doivent être manipulés dans des installations de confinement de sécurité biologique approuvées, et les récipients doivent être ouverts uniquement dans une enceinte de sécurité biologique certifiée. Il est recommandé d'utiliser de l'eau distillée déionisée de qualité biologie moléculaire dans la préparation du prélèvement d'ADN.
- En raison de la sensibilité analytique de ce test, il convient de prendre de très grandes précautions pour éviter la contamination des réactifs ou des mélanges d'amplification avec des échantillons, des contrôles ou des matériels amplifiés. Tous les réactifs doivent être surveillés attentivement pour détecter tout signe de contamination (p. ex., contrôles négatifs donnant des signaux positifs). Jeter les réactifs suspectés d'être contaminés.
- Afin de minimiser la contamination, porter des gants propres lors de la manipulation des échantillons et des réactifs et nettoyer fréquemment les plans de travail et les pipettes avant de réaliser la PCR.
- L'autoclavage n'élimine pas l'ADN issu d'une contamination. La progression du travail dans le laboratoire réalisant la PCR doit toujours se faire en sens unique entre des zones de travail séparées : préparation du mélange mère (master mix), suivie de la préparation des échantillons, puis amplification et enfin détection. N'introduire aucun ADN amplifié dans les zones réservées à la préparation du mélange mère (master mix) ou des échantillons.
- Toutes les pipettes et les pointes de pipette, ainsi que tout le matériel utilisé dans une zone particulière doivent être réservés à cette zone du laboratoire et ne jamais en sortir.
- Le matériel plastique doit être jetable et stérile dans la mesure du possible pour éviter une contamination de RNase, DNase ou croisée.

4.3. Conservation et manipulation

- Si le kit de test n'est pas utilisé immédiatement, il doit être **conservé 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 agités ou mélangés soigneusement avant utilisation pour une remise en suspension complète. Un vortexage excessif pourrait endommager l'ADN et causer la perte des fluorophores des amorces marquées.
- Les matériels sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.
- En raison de la concentration élevée en sel, les mélanges mères (master mixes) de PCR sont sensibles aux cycles de congélation/décongélation. Si nécessaire, aliquoter les mélanges mères (master mixes) en cryotubes à bouchon à vis avec joint.

5. Instruments

5.1. Thermocycleur

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

5.2. Instruments à électrophorèse capillaire ABI

- Utilisation ou fonction : détection et analyse de fragment
- Caractéristiques de performance et spécifications :
 - Les instruments à électrophorèse capillaire suivants peuvent être utilisés pour cette analyse :
 - Analyseur génétique ABI 310 (1 capillaire)
 - Analyseur génétique ABI 3100 Avant (4 capillaires)
 - Analyseur génétique ABI 3100 (16 capillaires)
 - Analyseur génétique ABI 3130 (4 capillaires)
 - Analyseur génétique ABI 3130xL (16 capillaires)
 - Analyseur génétique ABI 3500 (8 capillaires)
 - 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 standards de matrice adéquats comme indiqué à la section 7.2 *Matériel nécessaire (non fourni)*.
- Utiliser les paramètres par défaut pour votre type de polymère et de capillaire.
- Voir la section 7.5 : *Détection* pour la préparation des échantillons.

6. Prélèvement et préparation des échantillons

6.1. Précautions

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

6.2. Substances interférentes

Les substances suivantes sont connues pour 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** provenant des sources suivantes :

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

6.4. Préparation de l'échantillon

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

6.5. Conservation des échantillons

L'ADN génomique doit être conservé entre 2°C et 8°C ou entre -85°C et -65°C jusqu'à utilisation.

7. Procédure de test

7.1. Matériel fourni

Tableau 3. Matériels Fournis

Catalogue N°	Description
REF 22050011CE	TCRB Tube A – 6FAM & HEX
REF 22050021CE	TCRB Tube B – 6FAM
REF 22050031CE	TCRB Tube C – 6FAM & HEX
REF 22070021CE	TCRG Tube A – 6FAM & HEX
REF 22070041CE	TCRG Tube B – 6FAM & HEX
REF 20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM
REF 40880490	IVS-0009 Clonal Control DNA
REF 40880190	IVS-0004 Clonal Control DNA
REF 40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA
REF 40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA

7.2. Matériel nécessaire (non fourni)

Tableau 4. Matériels Requis (non-fournis)

Réactif/Matériel	Réactifs Recommandés /Matériels et Fournisseurs	N° de référence	Notes
ADN Polymérase	Roche: <ul style="list-style-type: none"> EagleTaq DNA Polymerase 	05206944190	S.O.
	Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> FalconTaq DNA Polymerase ou équivalent 	60970130	
Eau Distillée Déionisée de Biologie Moléculaire ou Stérile USP	S.O.	S.O.	L'eau doit être stérile et exempte de toute DNase et 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.	Doit être capable de mesurer précisément des volumes allant de 1µl à 1000µl.
Thermocycleur	Bio-Rad: <ul style="list-style-type: none"> MJ Research PTC-100 ou PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer <ul style="list-style-type: none"> PE 9600 ou PE 9700 	S.O.	S.O.
Vortex	S.O.	S.O.	S.O.
Plaques ou tubes PCR	S.O.	S.O.	Stériles
Cônes de pipette à filtre	S.O.	S.O.	Stériles, exempts de RNase/DNase/Pyrogène
Tubes Microcentrifuges	S.O.	S.O.	Stériles
Instrument ABI Electrophorèse Capillaire	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> ABI séries 310, 3100, 3130 ou 3500 	S.O.	S.O.
Formamide Hi-Di	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Hi-Di™ Formamide 	4311320	S.O.
Marqueur de Taille	Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> Hi-Di Formamide w/ROX size standards for ABI 3100 	60980061	S.O.
	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Pour les instruments ABI 3100 ou 3130: <ul style="list-style-type: none"> GeneScan® - 400HD [ROX]™ 	402985	
	<ul style="list-style-type: none"> Pour les instruments ABI 3500: <ul style="list-style-type: none"> GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0 	4408399	
Tampon	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> 10X Genetic Analyzer Buffer avec EDTA 	402824	Diluer au 1/10 ^{ème} dans de l'eau stérile avant utilisation

Réactif/Matériau	Réactifs Recommandés /Matériels et Fournisseurs	N° de référence	Notes
Jeux de Fluorophores (Dye Set) pour Calibration Spectrale	Thermo Fisher Scientific:		
	• Pour les instruments ABI 3100 et 3130:		
	▪ DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D)	4345827	
	• Pour les instruments ABI 310:		
▪ NED Matrix Standard	402996	S.O.	
▪ et Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX]	401546		
• Pour les instruments ABI 3500 :			
▪ DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)	4345833		
Polymère	Thermo Fisher Scientific:		
	• POP-4 [®] Polymer:		
	▪ POP-4 for 310 Genetic Analyzers	402838	
	▪ POP-4 for 3100/3100-Avant Genetic Analyzers	4316355	
	▪ POP-4 for 3130/3130xL Genetic Analyzers	4352755	S.O.
	• POP-7 [®] Polymer:		
▪ POP-7 for 3130/3130xL Genetic Analyzers	4352759		
▪ POP-7 for 3500/3500xL Genetic Analyzers	4393714		

7.3. Préparation des réactifs

- Tous les échantillons inconnus doivent être analysés avec le mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder. Cela garantit 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, nous recommandons de **dupliquer** chaque échantillon dans la mesure du possible. Si l'analyse dupliquée fournit des résultats incohérents, une nouvelle analyse ou réévaluation de l'échantillon est nécessaire.
- **Les contrôles positifs, négatifs et sans ADN** doivent être testés pour chaque mélange mère (master mix).

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

7.3.2. Sous une hotte de confinement, aliquoter un volume approprié de chaque mélange mère (master mix) dans des tubes microcentrifuges individuels propres et stériles.

- Les volumes d'aliquot doivent être 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 (master mix) (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 contrôle positif (voir la Tableau 6)
	+ 1	ADN contrôle négatif (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
	+ 1	contrôle négatif sans ADN (eau)
	+ 1	pour corriger les erreurs de pipetage
<hr/>		
n =	2 × Nbre d'échantillons + 4	Total

- Le volume d'aliquot total pour chaque mélange mère (master mix) doit être **n × 45 µL**.
- Pour chaque mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder, le nombre de réactions (**m**) doit être:

m =	Nbre d'échantillons	(analyser chaque échantillon une seule fois)
	+ 1	ADN contrôle positif (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
	+ 1	contrôle négatif sans ADN (eau)
	+ 1	pour corriger les erreurs de pipetage
<hr/>		
m =	Nbre d'échantillons + 3	Total

- Le volume d'aliquot total pour chaque mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder doit être **m × 45 µL**.

- 7.3.3. **Pour *TCRB* Tube A et B :** ajouter 2,25 unités (ou 0,45 µL à 5 unités/µL) d'ADN polymérase Taq à chaque mélange mère (master mix) par réaction.
- La quantité d'ADN polymérase Taq totale ajoutée à chaque mélange mère (master mix) doit être de **n × 0,45 µL**.
 - Vortexer doucement pour mélanger.
- 7.3.4. **Pour *TCRB* Tube C et *TCRG* Tube A et B ainsi que Specimen Control Size Ladder :** ajouter 1,25 unités (ou 0,25 µL à 5 unités/µL) d'ADN polymérase Taq par réaction.
- La quantité d'ADN polymérase Taq totale ajoutée à chaque mélange mère (master mix) doit être de **n × 0,25 µL** pour le mélange mère (master mix) *TCRB* Tube C et de **m × 0,25 µL** pour le mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder.
 - Vortexer doucement pour mélanger.
- 7.3.5. Pour chaque réaction, aliquoter 45 µL du mélange mère (master mix) approprié + la solution d'ADN polymérase dans les puits individuels d'une plaque ou dans un tube PCR.
- 7.3.6. Ajouter 5 µL de matrice appropriée (échantillon d'ADN, ADN contrôle positif, ADN contrôle négatif ou eau) aux puits individuels contenant les solutions de mélange mère (master mix) respectives. Aspirer et expulser plusieurs fois avec la pipette pour mélanger.
- 7.3.7. Reboucher ou couvrir la plaque PCR.
- Les échantillons sont maintenant prêts à être amplifiés dans le thermocycleur.
 - Si l'amplification ne peut pas être réalisée immédiatement après la préparation des réactifs, la plaque ou les tubes PCR peuvent être conservés entre 2°C et 8°C pendant 24 heures.

Guide pratique

Pour chaque Master Mix et n réactions, mélanger:

n × 45 µL	de mélange mère (Master Mix)
n × 0,25 µL ou 0,45 µL*	d'ADN polymérase Taq

Vortexer doucement pour mélanger.

Aliquoter 45 µL de Master Mix + la solution d'ADN polymérase dans chaque puit de réaction.

Ajouter 5 µL de matrice appropriée dans chaque puit

Volume Total de réaction = 50µl

*Remarque: Utiliser 0,45 µL d'ADN polymérase Taq pour *TCRB* Tubes A et B et 0,25 µL du d'ADN polymérase Taq pour *TCRB* Tube C et Specimen Control Size Ladder

7.4. Amplification

- 7.4.1. Amplifier les échantillons en utilisant le programme PCR suivant :
- Utilisation de l'option **calculated** (calculée) pour la mesure de la température avec les thermocycleurs BioRad MJ PTC.

Tableau 5. Conditions de cyclage thermique

Etape	Temperature	Durée	Cycle
1	95°C	7 minutes	1
2	95°C	45 secondes	35
3	60°C	45 secondes	
4	72°C	90 secondes	
5	72°C	10 minutes	1
6	15°C	∞	1

- 7.4.2. Retirer la plaque ou les tubes d'amplification du thermocycleur.
- Bien que l'ADN amplifié soit stable à température ambiante pour des périodes de temps prolongées, les produits PCR doivent être conservés entre 2°C et 8°C jusqu'à détection. La détection doit être effectuée dans les 30 jours qui suivent l'amplification.

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

Veillez noter qu'un pic précurseur est souvent visible lors de la détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI. 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 (master mix) Specimen Control Size Ladder où le pic des 96 nucléotides comporte un pic précurseur visible à 84 paire de base.

- Ne multiplexage pas des produits PCR de différents mélanges mères (master mixes) qui réduit la sensibilité globale de l'analyse.

Plateformes ABI 310, 3100, OU 3130

- 7.5.1. Dans un tube microcentrifuge non utilisé, mélanger une quantité appropriée (pour un total de 10 µL par réaction PCR) de Formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille ROX.^a 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 PCR.
- 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 liste des échantillons et une liste d'injection des échantillons.
- 7.5.7. Analyser les échantillons avec l'instrument à 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 les sections 8 *Interprétation des résultats* et 10: *Valeurs attendues* ci-dessous.)

Plateformes ABI 3500 :

Remarque : Compte tenu des écarts de performance entre les instruments ABI 3500, les quantités de formamide, d'échantillon et de marqueurs de taille standard (size standards) 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 tube microcentrifuge non utilisé, mélanger une quantité appropriée (9,5 µL par réaction PCR) de Formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille LIZ.^a 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 individuel pour chaque réaction PCR.
- 7.5.11. Transférer 0,5 µL de chaque réaction PCR 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 ou couvrir la plaque PCR.
- 7.5.13. Dénaturer à la chaleur les échantillons à 95°C pendant 3 minutes puis réfrigérer brusquement dans de la glace pendant 5 minutes.
- 7.5.14. Préparer une liste des échantillons et une liste d'injection des échantillons.
- 7.5.15. Analyser les échantillons avec l'instrument à 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 les sections 8 *Interprétation des résultats* et 10: *Valeurs attendues*.)

^a**Remarque :** Veuillez consulter les instructions d'utilisation fournies avec les produits Applied Biosystems concernant le mélange du Formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille standard pour les différents instruments ABI.

7.6. Contrôle qualité

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

7.7. Contrôles positifs recommandés

Les tailles des amplicons figurant ci-dessous ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI. Les tailles d'amplicons visibles sur votre instrument à électrophorèse capillaire spécifique peuvent différer de 1 à 4 paire de base (pb) de celles figurant ci-après selon la plateforme de détection et la version du logiciel d'analyse utilisé. Une fois identifiée, la taille de l'amplicon déterminée sur votre plateforme spécifique sera cohérente 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 (master mix) en utilisant les paramètres de couleur par défaut des systèmes de détection par fluorescence ABI. Les tailles des amplicons figurant ci-dessous ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI.

Tableau 6. Contrôles Positifs Recommandés

Mélange mère	Cible	Couleur	ADN Contrôle	N°de référence	Taille du Produit (pb)
<i>TCRB</i> Tube A	Vβ + Jβ1/2	Bleu (Jβ2.X) + Vert (Jβ1.X)	Taille Attendue IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	240 - 285 264
<i>TCRB</i> Tube B	Vβ + Jβ2	Bleu (Jβ2.X)	Taille Attendue IVS-0004 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40880190 40881210	240 - 285 253 267
<i>TCRB</i> Tube C	Dβ + Jβ1/2	Bleu (Jβ2.X) + Vert (Jβ1.X)	Taille Attendue IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	170 - 210 (Dβ2), 285 - 325 (Dβ1) 309
<i>TCRG</i> Tube A	Vγ1-8 + Vγ10 + différentes régions Jγ	Bleu (Jγ1,1/2,1) + Vert (Jγ1,3/2,3)	Taille Attendue IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40881210	145 - 255 211 (Vγ1-8 + Jγ1,3/2,3)
<i>TCRG</i> Tube B	Vγ9 + Vγ11 + différentes régions Jγ	Bleu (Jγ1,1/2,1) + Vert (Jγ1,3/2,3)	Taille Attendue IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40881210	80 - 220 167 (Vγ9 + Jγ1,3/2,3)
Specimen Control Size Ladder	Gènes Multiples	Bleu	Taille Attendue IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397, 602 ^a 96, 197, 297, 397, 602 ^a

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

8. Interprétation des résultats

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

8.1. Analyse

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

Tableau 7. Le tableau suivant décrit l'analyse de chaque contrôle, et les décisions nécessaires basées sur les résultats.

Type de Contrôle	Résultats Attendus	Résultats Aberrants
Contrôle négatif sans ADN	Aucune amplification, continuer l'analyse	Amplification présente, refaire l'analyse.
Contrôle polyclonal	La taille du produit est cohérente avec la taille attendue listée dans la section 10.1 <i>Taille attendue des produits amplifiés</i> . Aucun réarrangement clonal n'est présent. Continuer l'analyse.	Des réarrangements clonaux sont présents. Refaire l'analyse.
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 listée dans la section 10.1 <i>Taille attendue des produits amplifiés</i> . Continuer l'analyse.	La taille du produit est en dehors de la plage de taille valide. Refaire l'analyse.
Specimen Control Size Ladder (Ce contrôle d'amplification est <u>essentiel</u> pour les échantillons de quantité et qualité inconnues.)	Si tous les pics de 96, 197, 297, 397 et 602 pb sont visibles, continuer l'analyse. Parce que des fragments d'ADN plus petits sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare pour le fragment 600pb d'avoir un signal diminué ou complètement absent. Continuer l'analyse.	Si aucune bande n'est visible, refaire l'analyse <u>sauf si le prélèvement est positif</u> . Si seulement 1, 2, ou 3 bandes sont visibles, re-évaluer l'échantillon pour la dégradation de l'ADN <u>sauf si le prélèvement 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 :

- Une ou deux bande(s) positive(s) proéminente(s)^a dans la plage de taille attendue est interprété comme :
« Positif pour la détection de réarrangement(s) clonal (aux) de gène de la chaîne bêta ou de la chaîne gamma des récepteurs des lymphocytes T indicatif de la présence d'une population cellulaire clonale. Dans le contexte d'un critère de diagnostic global, les populations cellulaires clonales peuvent indiquer la présence d'une tumeur maligne hématologique. »
- Une absence de bande(s) positive(s)^a dans la plage de taille attendue est interprété comme :
« Négatif pour la détection de réarrangement(s) clonal(aux) de gène de la chaîne bêta ou de la chaîne gamma des récepteurs des lymphocytes T. »

^aRemarque : les critères de définition d'une bande positive 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 aux produits clonaux d'amplicons obtenus précédemment du même patient avec l'utilisation du même mélange mère (master mix) correspondent à un pic positif. Les produits des échantillons figurant dans la plage de taille attendue et produisant une ou des bandes séparées distinctes de toute traînée (« smear ») de fond correspondent à des bandes positives.

9. Limites de la procédure

- Ce test n'identifie pas 100 % des populations cellulaires clonales.
- Ce test ne peut détecter de manière fiable moins de 1 cellule positive pour 100 cellules normales.
- Les résultats des tests de clonalité moléculaire doivent toujours être interprétés dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.
- Les analyses PCR sont sujettes à des interférences dues à la dégradation de l'ADN ou à l'inhibition de la PCR par l'EDTA, l'héparine ou d'autres agents.

10. Valeurs attendues

10.1. Taille attendue des produits amplifiés

Les tailles des amplicons figurant ci-dessous ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI. Les tailles d'amplicons visibles sur votre instrument à 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 utilisé. Une fois identifiée, la taille de l'amplicon déterminée sur votre plateforme spécifique sera cohérente 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 (master mix) en utilisant les paramètres de couleur par défaut des systèmes de détection par fluorescence ABI. Les tailles des amplicons figurant ci-dessous ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI.

Tableau 8. Taille Attendue des Produits Amplifiés

Mélange mère	Cible	Couleur	ADN Contrôle	N° de référence	Taille du Produit (pb)
<i>TCRB</i> Tube A	Vβ + Jβ1/2	Bleu (Jβ2,X) + Vert (Jβ1,X)	Taille Attendue	---	240 - 285
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	4092-0010	240 - 285, 271 ^a
			IVS-0009 Clonal Control DNA	4088-0490	264
<i>TCRB</i> Tube B	Vβ + Jβ2	Bleu (Jβ2,X)	Taille Attendue	---	240 - 285
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	240 - 285, 221 ^b
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	---
<i>TCRB</i> Tube C	Dβ + Jβ1/2	Bleu (Jβ2,X) + Vert (Jβ1,X)	Taille Attendue	---	170 - 210 (Dβ2), 285 - 325 (Dβ1)
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	128 ^b , 170 - 210, 285-325, 337 ^b
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	309
<i>TCRG</i> Tube A	Vγ1-8 + Vγ10 + différentes régions Jγ	Bleu (Jγ 1,1/2,1) + Vert (Jγ 1,3/2,3)	Taille Attendue	---	145 - 255
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	230 - 255 (Vγ1-8 + Jγ1,1/2,1),
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	195 - 230 (Vγ1-8 + Jγ1,3/2,3),
<i>TCRG</i> Tube B	Vγ9 + Vγ11 + différentes régions Jγ	Bleu (Jγ 1,1/2,1) + Vert (Jγ 1,3/2,3)	Taille Attendue	---	175 - 195 (Vγ10 + Jγ1,1/2,1),
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	145 - 175 (Vγ10 + Jγ1,3/2,3)
			IVS-0021 Clonal Control DNA	40881210	212 (Vγ1-8 + Jγ1,3/2,3)
Specimen Control Size Ladder	Gènes Multiples	Bleu	Taille Attendue	---	80 - 220
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	195 - 220 (Vγ9 + Jγ1,1/2,1),
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	160 - 195^c (Vγ9 + Jγ1,3/2,3),
				40881210	110 - 140^d (Vγ11 + Jγ1,1/2,1),
				40881210	80 - 110^d (Vγ11 + Jγ1,3/2,3)
				40881210	115 ^e (Vγ11 + Jγ1,3/2,3)
				40881210	167 (Vγ9 + Jγ1,3/2,3)
				40920010	96, 197, 297, 397, 602^e
				40920010	96, 197, 297, 397, 602 ^e

^aRemarque: la bande de 271 pb est notamment visible dans les échantillons comportant un faible nombre de lymphocytes contaminants.

^bRemarque: dans des conditions sous-optimales, des produits non spécifiques de 221 pb (dans le Tube B) et de 128 et 337 pb (dans le Tube C) peuvent être détectés. Si ces bandes sont présentes, elles sont généralement faibles.

^cRemarque: un produit d'amplification n'est généralement pas visible dans cette plage de taille.

^dRemarque: un produit d'amplification n'est généralement pas visible dans cette plage de taille. Il s'agit d'un répertoire extrêmement restreint.

^eRemarque: cela peut être visible sous forme d'amplicon faible.

^fRemarque: 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 pb.

10.2. Données de l'échantillon

Les données figurant ci-dessous ont été obtenues avec les mélanges mères (master mixes) indiqués. Les produits amplifiés ont été analysés sur un instrument ABI.

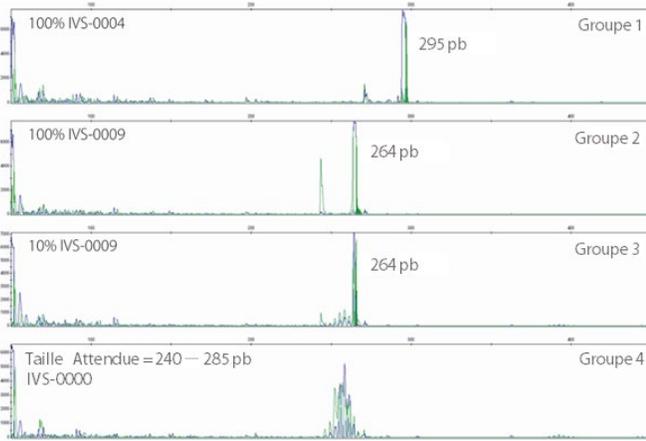


Figure 2. TCRB Tube A - 6FAM & HEX

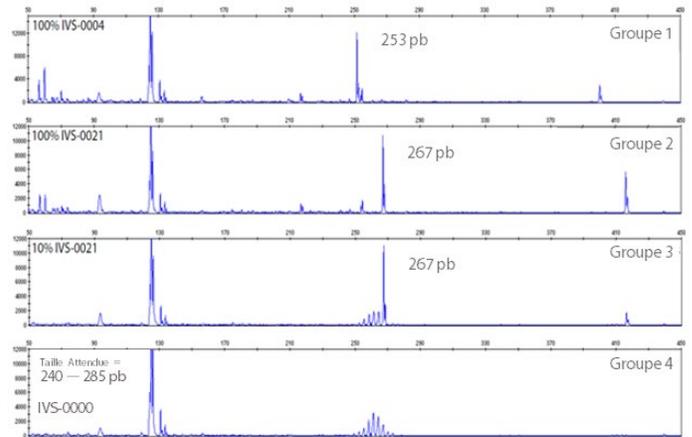


Figure 3. TCRB Tube B - 6FAM

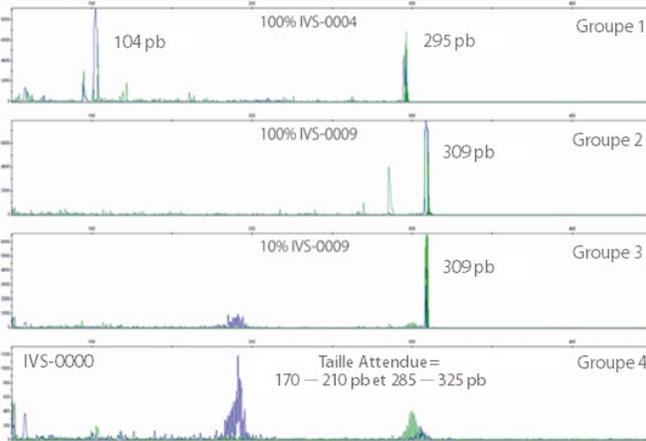


Figure 4. TCRB Tube C - 6FAM & HEX

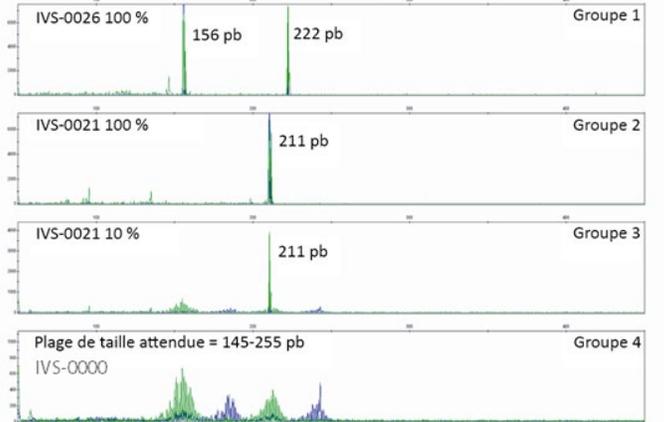


Figure 5. TCRG Tube A - 6FAM & HEX

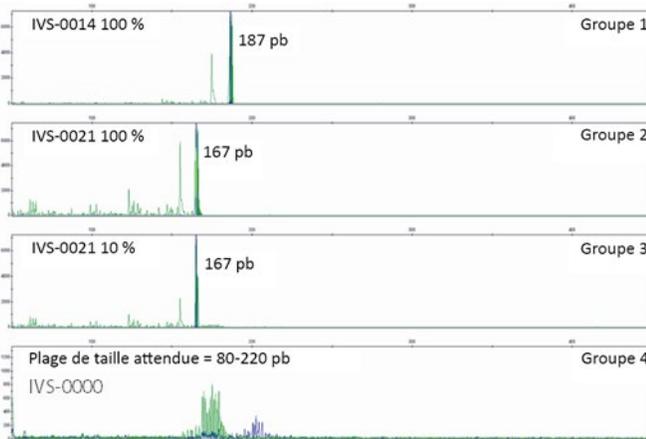


Figure 6. TCRG Tube B - 6FAM & HEX

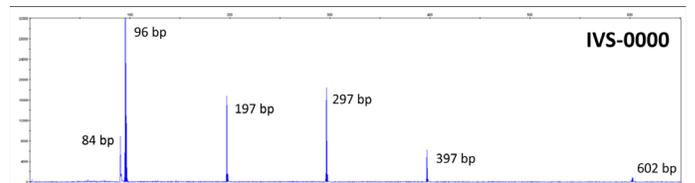


Figure 7. Pour le mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder

11. Caractéristiques de performance

Ce test PCR IdentiClone *TCRB + TCRG* T-Cell Clonality est une procédure rapide et fiable qui est bien plus sensible que l'analyse Southern Blot (SB) dans la détection de clonalité chez les patients suspectés d'être atteints de syndromes lymphoprolifératifs. Le diagnostic clinico-histopathologique final est bien corrélé aux résultats PCR chez un nombre plus élevé de patients en comparaison avec les résultats du SB. C'est ce que montrent deux articles de référence, l'un publié en 2003 dans *Leukemia* par van Dongen *et al.* et l'autre publié en 2005 dans le *Journal of Molecular Diagnostics (JMD)* par Sandberg *et al.*

Tableau 9. Taille

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

Tableau 10. PCR vs. l'analyse SB relative à l'histopathologie et au diagnostic final :

	PCR/SB concordance:	PCR sensibilité:	SB sensibilité:
<i>IGH + IGK</i> :	85%	98%	39%
<i>TCRB</i> :	85%	96%	35%

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

12. Service 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

13. Bibliographie

1. Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Mol. Diag.* 1999, **4(2)**:101-117.
2. Van Dongen, JJM *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T- cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98- 3936. *Leukemia* 2003, **17(12)**:2257-2317.
3. Sandberg, Y, van Gastel-Mol, EJ, Verhaaf, B, Lam, KH, van Dongen, JJM, Langerak, AW. BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern Blot analysis in routine clonality diagnostics. *J. Mol. Diag.* 2005, **7(4)**:495-503.
4. Van Krieken, JHJM, *et al.* Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007, **21(2)**:201-206.

14. Symboles

Les symboles suivants sont désormais utilisés pour l'étiquetage des produits de diagnostic NGS 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 Instructions. Si un produit est couvert par un produit, il s'agit d'une politique visant à remplacer le produit ou à créditer le prix d'achat total. Invivoscribe® ne fournit aucune autre garantie, explicite ou implicite, de quelque nature que ce soit. La responsabilité d'Invivoscribe® ne dépassera pas le prix d'achat du produit. Se renseigner sur les résultats d'une enquête produits dans des conditions contrôlées par l'acheteur dans le laboratoire de l'acheteur doivent être établis et surveillés en permanence par l'acheteur. La commande, l'acceptation et l'utilisation du produit constituent une responsabilité de la part de l'acheteur pour l'efficacité du produit et son acceptation de la limitation de la responsabilité.

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

15.2. Brevets et Marques

Numéro de brevet européen 2418287, Numéro de brevet européen 2460889, Numéro de brevet européen 4708029, Brevet des États-Unis d'Amérique 8859748, et demandes connexes en instance et à venir. Tous les brevets et toutes les applications sont concédés sous licence exclusive à Invivoscribe®. Les brevets supplémentaires concédés sous licence à Invivoscribe pour certains de ces produits s'appliquent ailleurs. Nombre de ces produits nécessitent des méthodes d'amplification d'acide nucléique telles que la réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Aucune licence sous ces brevets.

Identiclone® est une marque déposée d'Invivoscribe®

©2023 Invivoscribe, Inc. Tous droits réservés. Les marques commerciales mentionnées ici sont la propriété d'Invivoscribe, Inc. et / ou de ses filiales ou de leurs propriétaires respectifs.