

Instructions d'utilisation

CE IVD

## IdentiClone® T Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0

Destiné à l'identification de la clonalité des lymphocytes T

**IVD** Destiné au diagnostic *in vitro*

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

N° de référence	Produits	Quantité
<b>REF</b> 92070101	IdentiClone T Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0	33 réactions
<b>REF</b> 92070111	IdentiClone T-Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0 MegaKit	330 réactions

## Table des matières

<b>1.</b>	<b>UTILISATION PREVUE.....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>RESUME ET EXPLICATION DU TEST.....</b>	<b>3</b>
2.1.	Contexte .....	3
2.2.	Résumé.....	3
<b>3.</b>	<b>PRINCIPES DE LA PROCEDURE.....</b>	<b>4</b>
3.1.	Amplification en chaîne par polymérase (PCR).....	4
3.2.	Détection par fluorescence.....	4
<b>4.</b>	<b>REACTIFS .....</b>	<b>5</b>
4.1.	Composants.....	5
4.2.	Mises en garde et précautions .....	5
4.3.	Conservation et manipulation .....	6
<b>5.</b>	<b>INSTRUMENTS.....</b>	<b>6</b>
5.1.	Thermocycleur.....	6
5.2.	Instruments à électrophorèse capillaire ABI.....	6
<b>6.</b>	<b>PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS.....</b>	<b>7</b>
6.1.	Précautions.....	7
6.2.	Substances interférentes.....	7
6.3.	Conditions de prélèvement et manipulation .....	7
6.4.	Préparation de l'échantillon .....	7
6.5.	Conservation des échantillons.....	7
<b>7.</b>	<b>PROCEDURE DE TEST.....</b>	<b>7</b>
7.1.	Matériel fourni .....	7
7.2.	Matériel nécessaire (mais non fourni).....	8
7.3.	Préparation des réactifs.....	9
7.4.	Amplification.....	10
7.5.	Détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI .....	10
7.6.	Analyse des données .....	11
7.7.	Contrôle qualité .....	12
7.8.	Contrôle du test .....	13
<b>8.</b>	<b>INTERPRETATION DES RESULTATS.....</b>	<b>14</b>
8.1.	Analyse .....	14
8.2.	Interprétation de l'échantillon .....	14
<b>9.</b>	<b>LIMITES DE LA PROCEDURE.....</b>	<b>15</b>
<b>10.</b>	<b>VALEURS ATTENDUES.....</b>	<b>15</b>
10.1.	Taille attendue des produits amplifiés .....	15
10.2.	Données de l'échantillon .....	16
<b>11.</b>	<b>CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE .....</b>	<b>16</b>
<b>12.</b>	<b>SUPPORT TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT .....</b>	<b>19</b>
<b>13.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>19</b>
<b>14.</b>	<b>SYMBOLES .....</b>	<b>19</b>
<b>15.</b>	<b>INFORMATIONS LEGALES.....</b>	<b>20</b>
15.1.	Garantie et responsabilité.....	20
15.2.	Brevets et marques .....	20
15.3.	Avis à l'acheteur – ADN polymérase EagleTaq UNIQUEMENT .....	20

## 1. Utilisation prévue

Le test IdentiClone T Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0 est un produit de diagnostic in vitro destiné à la détection des réarrangements clonaux du gène de chaîne gamma des récepteurs des lymphocytes T par amplification en chaîne par polymérase (PCR) chez les patients suspectés d'être atteints de syndromes lymphoprolifératifs.

Plus particulièrement, le test T Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0 peut être utilisé pour identifier la clonalité chez les patients suspectés d'être atteints de syndromes lymphoprolifératifs.

## 2. Résumé et explication du test

### 2.1. Contexte

Les réarrangements de gènes du récepteur antigénique se produisent pendant l'ontogenèse des lymphocytes B et T et génèrent des produits de longueur et de séquence uniques pour chaque cellule. Les analyses par amplification en chaîne par polymérase (PCR) peuvent être utilisées pour identifier les populations de lymphocytes issues d'une seule cellule en détectant les réarrangements de gène V-J uniques présents dans les loci du gène du récepteur antigénique.<sup>1</sup> Ce test PCR IdentiClone utilise différentes amorces ADN consensus ciblant les régions conservées des gènes de la chaîne gamma des récepteurs des lymphocytes T. L'amplification de la région à l'aide d'amorces marquées par fluorescence est suivie d'un fractionnement par électrophorèse capillaire et d'une analyse par le logiciel de l'instrument. Ce test reposant sur l'ADN est conçu pour détecter la majeure partie des populations de lymphocytes T clonales. La présence ou l'absence de clonalité permet d'établir le diagnostic différentiel entre des lésions réactives et certaines tumeurs malignes à lymphocytes T et B.

Ce test ne peut détecter de manière fiable la présence d'une clonalité correspondant à moins de 5 % de la population totale de lymphocytes. Toujours interpréter les résultats des tests de clonalité moléculaire dans le contexte de l'ensemble des données cliniques, histologiques et immunophénotypiques disponibles.

### 2.2. Résumé

Ce kit de test contient un mélange mère (master mix) unique composé d'amorces qui ciblent les régions V $\gamma$ 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10 et 11 ainsi que J $\gamma$ 1/J $\gamma$ 2, J $\gamma$ P et J $\gamma$ P1/J $\gamma$ P2, générant des amplicons de PCR dont la taille attendue est comprise entre 159 et 207 nucléotides (nt). Le mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder (Marqueur de Taille Contrôle) cible plusieurs gènes et génère une série d'amplicons d'environ 100, 200, 300, 400 et 600 nucléotides afin de garantir que la qualité et la quantité d'ADN introduit soient suffisantes à l'obtention d'un résultat fiable. La procédure utilise un seul programme du thermocycleur et une méthodologie de détection similaire pour tous les tests de clonalité génique Invivoscribe, ce qui améliore la cohérence et facilite l'apprentissage croisé d'une large gamme de tests différents.

L'analyse des pics est facilitée grâce à un algorithme informatique qui calcule le rapport de hauteur des pics relatif (RPR) et une valeur D(x) du paramètre statistique pour chaque pic. Le RPR est calculé en divisant la hauteur de chaque pic par celle du plus petit pic voisin et doit être supérieur au seuil de 4,0. La valeur D(x) est basée sur une variation du test de Kolmogorov-Smirnov, qui compare deux distributions empiriques et détermine si elles sont statistiquement différentes, et sa valeur doit être supérieure à 0,0419.

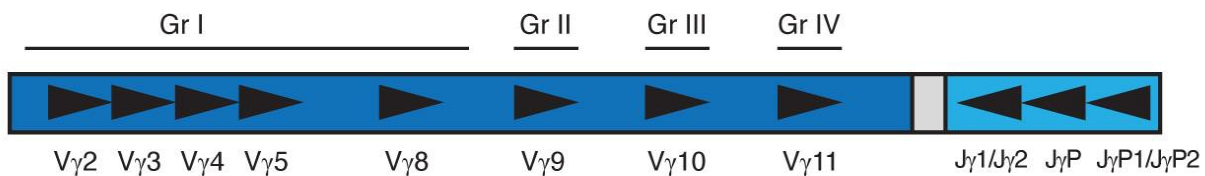
Ce test a été développé par Invivoscribe. La performance de ce test a été évaluée et validée par le groupe EuroClonality/BIOMED-2. Manuscrit Euroclonality en cours de préparation : étude multicentrique évaluant 250 échantillons de patients cliniques.



### 3. Principes de la procédure

#### 3.1. Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Les tests PCR sont utilisés en routine pour l'identification de populations clonales de lymphocytes T. Ce test amplifie l'ADN entre les amorces qui ciblent les régions conservées au sein des régions variable (V) et de jonction (J) qui flanquent la région hypervariable unique 3 de liaison à l'antigène (CDR3). 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 des immunoglobulines 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 qui flanquent la région V-J, une distribution gaussienne (courbe en cloche) des produits d'amplification dans la plage de taille attendue est générée. 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 détecté). L'ADN provenant d'échantillons contenant une population clonale donne un résultat correspondant à un ou deux produits amplifiés (amplicons) majeurs sur un fond polyclonal réduit.



**Figure 1.** Ce diagramme représentant le gène gamma des récepteurs des lymphocytes T montre le positionnement approximatif des amorces d'ADN en amont et en aval.

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 ADN de ces régions. Ainsi, un mélange mère (master mix) de multiplexes, qui cible différentes régions V et J (Figure 1), est nécessaire pour détecter la majorité des réarrangements clonaux. Comme indiqué, les réarrangements clonaux sont identifiés comme un ou deux produits de taille unique proéminents sur le fond des produits d'amplification de tailles variables qui forment la distribution gaussienne autour d'une taille moyenne d'un réarrangement statistiquement majoritaire.

#### 3.2. Détection par fluorescence

La détection par fluorescence est couramment employée pour séparer les produits d'amplification de différentes tailles avec un instrument à électrophorèse capillaire. Les amorces sont conjuguées avec un marqueur fluorescent (fluorophore) 6FAM afin d'être détectées après excitation par le laser de l'instrument à électrophorèse capillaire. Ce système de détection à haute sensibilité fournit une résolution au nucléotide près et une quantification relative. La reproductibilité inter-test et intra-test dans la détermination de la taille par électrophorèse capillaire est d'environ 1 à 2 nucléotides. Cette reproductibilité et cette sensibilité couplées à l'archivage automatique des données de l'échantillon permettent le suivi, la traçabilité et la comparaison des données du patient dans le temps.

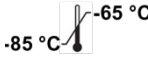

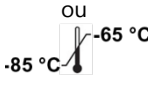
## 4. Réactifs

### 4.1. Composants

Tableau 1. Kits disponibles

N° de référence	Description	Quantité
<b>REF</b> 92070101	IdentiClone T-Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0	33 réactions
<b>REF</b> 92070111	IdentiClone T-Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0 MegaKit	330 réactions

Tableau 2. Composants du réactif

Réactif	N° de référence	Composants du réactif (substances actives)	Quantité unitaire	92070101 Nb d'unités	92070111 Nb d'unités	Temp. de conservation
<b>Mélanges mères</b>	22070091	<b>TCRG – 6FAM</b> Oligonucléotides multiples ciblant les régions V $\gamma$ 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10 et 11, J $\gamma$ 1/J $\gamma$ 2, J $\gamma$ P et J $\gamma$ P1/J $\gamma$ P2 du gène gamma des récepteurs des lymphocytes T en solution saline tamponnée.	1 500 $\mu$ l	1	10	
<b>Matrice : Mélange mère témoin</b>	20960021	<b>Specimen Control Size Ladder – 6FAM</b> Oligonucléotides multiples ciblant des gènes domestiques.	1 500 $\mu$ l	1	10	
<b>ADN contrôle positif</b>	40883320	<b>ADN contrôle positif TCRG 5 %</b> 50 $\mu$ g/ml d'ADN dans une solution TE à 1/10 <sup>e</sup>	50 $\mu$ l	1	5	
<b>ADN contrôle négatif (normal)</b>	40920020	<b>ADN contrôle négatif TCRG</b> 50 $\mu$ g/ml d'ADN dans une solution TE à 1/10 <sup>e</sup>	50 $\mu$ l	1	5	

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

### 4.2. Mises en garde et précautions

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

### 4.3. Conservation et manipulation

- Si les kits de test ne sont pas utilisés immédiatement, **ils doivent être conservés entre -65 C et -85 °C.**
- La température de conservation optimale des ADN contrôles est de 2 à 8 °C, mais l'ADN contrôle peut également être conservé entre -85 et -65 °C.
- Tous les réactifs et les contrôles doivent être décongelés et agités ou mélangés soigneusement avant utilisation pour un mélange complet. Un vortexage excessif pourrait 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.
- Les mélanges mères (master mixes) et les contrôles destinés à la PCR ont été validés pour 6 cycles de congélation/décongélation sans perte de performance. Aliquoter les réactifs dans des tubes à bouchon à vis avec joint si d'autres cycles de congélation/décongélation sont nécessaires.

## 5. Instruments

### 5.1. Thermocycleur

- Utilisation ou fonction : amplification d'échantillons d'ADN
- Caractéristiques de performance et spécifications :
  - Plage de température minimale : 15 à 96 °C
  - Vitesse minimale de montée en température : 0,8 °C/s
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et 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 d'électrophorèse capillaire suivants peuvent être utilisés pour ce test :
    - 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 3500XL (24 capillaires)
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.
- L'instrument ABI doit être étalonné avec les Matrix Standards (Standards de Matrice) adéquats comme indiqué à la section 7.2 : *Matériel nécessaire mais non fourni.*
- Utiliser les paramètres par défaut correspondant à votre type de polymère et de capillaire.
- Voir la section 7.5 : *Détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI* pour plus d'informations.

\*Mise en garde : ces produits ne comportent pas le marquage CE.

## 6. Prélèvement et préparation des échantillons

### 6.1. Précautions

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

### 6.2. Substances interférentes

Les substances suivantes peuvent interférer avec la PCR :

- Chélateurs de cations divalents
- Pointes de pipette à faible rétention
- EDTA
- Héparine

### 6.3. Conditions de prélèvement et manipulation

Ce test analyse l'ADN génomique extrait et purifié à partir de sang périphérique, d'aspiration de moelle osseuse ou de tissus inclus en paraffine.

### 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 10 µg à 200 µg par ml dans du TE dilué au 1/10e (1 mM de Tris-HCl, pH 8,0 ; 0,1 mM d'EDTA) ou dans de l'eau de qualité biologie moléculaire ou USP. Il s'agit d'un système d'analyse sensible. Une large gamme de concentrations d'ADN générera un résultat fiable. Par conséquent, la quantification et l'ajustement des concentrations d'ADN ne sont généralement pas nécessaires. L'analyse de l'échantillon d'ADN avec le mélange mère (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

Conserver l'ADN génomique à une température comprise entre 2 et 8 °C ou -85 et -65 °C pour une conservation à long terme.

## 7. Procédure de test

### 7.1. Matériel fourni

Tableau 3. Matériel fourni

N° de référence	Description
22070091CE	<i>TCRG</i> – 6FAM
20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM (Marqueur de Taille Contrôle – 6FAM)
40883320	5% <i>TCRG</i> Positive Control DNA (ADN Contrôle Positif <i>TCRG</i> 5 %)
40920020	<i>TCRG</i> Negative Control DNA (ADN Contrôle Négatif <i>TCRG</i> )

## 7.2. Matériel nécessaire (mais non fourni)

Tableau 4. Matériel nécessaire (mais non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs ou matériels recommandés et fournisseurs	N° de référence	Remarques
<b>ADN polymérase</b>	Roche : <ul style="list-style-type: none"> <li>DNA polymerase (ADN polymérase) EagleTaq</li> </ul> Invivoscribe, Inc. : <ul style="list-style-type: none"> <li>DNA polymerase (ADN Polymérase) EagleTaq<sup>1</sup> ou équivalent</li> </ul>	5206944190 60980100	S.O. (sans objet)
<b>Eau distillée désionisée de qualité biologie moléculaire ou USP</b>	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	L'eau doit être stérile et exempte de toute DNase et RNase.
<b>Pipettes étalonnées</b>	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	Précision requise pour mesurer des volumes allant de 1 µl à 1 000 µl.
<b>Thermocycleur</b>	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)
<b>Vortex</b>	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)
<b>Plaques ou tubes PCR</b>	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	Stériles
<b>Pointes de pipette à filtre</b>	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	Stériles, exemptes de RNase/DNase/pyrogène
<b>Microtubes à centrifuger</b>	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	Stériles
<b>Formamide Hi-Di</b>	Invivoscribe, Inc. : <ul style="list-style-type: none"> <li>HI-Deionized Formamide (Formamide hautement déionisée)</li> </ul> Applied Biosystems : <ul style="list-style-type: none"> <li>Hi-Di™ Formamide (Formamide Hi-Di™)</li> </ul>	60980041 4311320	S.O. (sans objet)
<b>Instrument d'électrophorèse capillaire ABI</b>	Applied Biosystems : <ul style="list-style-type: none"> <li>séries ABI 3100, 3130 ou 3500</li> </ul>	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)
<b>Marqueurs de taille standard</b>	Invivoscribe, Inc. : <ul style="list-style-type: none"> <li>Formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille ROX pour ABI 3100</li> </ul> Applied Biosystems : <ul style="list-style-type: none"> <li>Pour les instruments ABI 3100 ou 3130 :  <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan™ - 400HD [ROX]™</li> </ul> </li> <li>Pour les instruments ABI 3500 :  <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0</li> </ul> </li> </ul>	60980061 402985 4408399	S.O. (sans objet)
<b>Jeux de fluorophores (Dye sets) pour calibration spectrale</b>	Applied Biosystems : <ul style="list-style-type: none"> <li>Pour les instruments ABI 3100 et 3130 :  <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D) (Kit Standard DS-30 Matrix (Jeu de Fluorophores D)</li> </ul> </li> <li>Pour les instruments ABI 3500 :  <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) (Kit Standard DS-33 Matrix (Jeu de Fluorophores G5)</li> </ul> </li> </ul>	4345827 4345833	S.O. (sans objet)



Tableau 4. Matériel nécessaire (mais non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs ou matériels recommandés et fournisseurs	N° de référence	Remarques
<b>Polymère</b>	Applied Biosystems : <ul style="list-style-type: none"> <li>POP-7 Polymer (Polymère POP-7) : <ul style="list-style-type: none"> <li>POP-7™ for 3130/3130XL/3500XL Genetic Analyzers (POP-7™ pour Analyseurs Génétiques 3130/3130XL/3500XL)</li> </ul> </li> </ul>	4352759	S.O. (sans objet)

**Remarque :** ce produit est approuvé pour la vente et l'utilisation dans l'Espace économique européen uniquement. Il ne doit pas être revendu ou transféré à un tiers. Consultez également les informations légales à la section 15.

### 7.3. Préparation des réactifs

- Tous les échantillons peuvent être analysés avec le mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder (Marqueur de Taille Contrôle) afin de garantir que les échantillons d'ADN ne contiennent pas d'inhibiteur d'amplification et qu'ils sont de qualité adéquate et en quantité suffisante pour générer des résultats fiables.
- Analyser les échantillons en double. Si l'analyse dupliquée fournit des résultats incohérents, une nouvelle analyse ou réévaluation de l'échantillon est nécessaire.
- Les contrôles positif, négatif et négatif sans ADN doivent être analysés.

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

7.3.2. Prélever le volume calculé de chaque mélange mère (master mix) et les transférer dans des microtubes à centrifuger individuels.

- Les volumes d'aliquot doivent être de 45 µl pour chaque réaction.
- Ajouter un excédent de 15 % afin de garantir la disponibilité d'un volume adéquat.
- Pour le mélange mère (master mix) *TCRG* – 6FAM, le nombre de réactions (**n**) est :

<b>n = 2 × nb d'échantillons</b>	(analyser chaque échantillon en double)
+ 1	5% <i>TCRG</i> Positive Control DNA (ADN contrôle positif <i>TCRG</i> 5 %)
+ 1	<i>TCRG</i> Negative Control DNA (ADN contrôle négatif <i>TCRG</i> )
+ 1	contrôle négatif sans ADN (eau)
+ 1	réaction supplémentaire

---

**n = 2 × nb d'échantillons + 4      Total**

- Le volume d'aliquot total pour le mélange mère (master mix) *TCRG* – 6FAM sera **n × 45 µl**.
- Pour chaque mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder, le nombre de réactions (**m**) est :

<b>m = nb d'échantillons</b>	(analyser chaque échantillon une seule fois)
+ 1	<i>TCRG</i> Negative Control DNA (ADN contrôle négatif <i>TCRG</i> )
+ 1	Contrôle négatif sans ADN (eau)
+ 1	réaction supplémentaire

---

**m = nb d'échantillons + 3      Total**

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

7.3.3. Ajouter 1,25 unités (ou 0,25 µl à 5 unités/µl) d'ADN polymérase EagleTaq à chaque mélange mère (master mix) par réaction.

- Ajouter **n × 0,25 µl** d'ADN polymérase EagleTaq au mélange mère (master mix) *TCRG* et **m × 0,25 µl** d'ADN polymérase EagleTaq au mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder. Vortexer doucement pour mélanger.

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

- 7.3.5. Ajouter 5 µl de matrice appropriée (échantillon d'ADN, ADN contrôle positif, ADN contrôle négatif ou eau) aux puits individuels contenant les solutions de mélange mère (master mix) respectives. Aspirer et expulser plusieurs fois avec la pipette pour mélanger.
- 7.3.6. Reboucher ou couvrir la plaque PCR.
- Les échantillons sont maintenant prêts à être amplifiés dans le thermocycleur.

#### Guide pratique

Pour chaque mélange mère (master mix) et **n** réactions, mélanger :

**n × 45 µl** Mélange mère  
**n × 0,25 µl** ADN polymérase Taq

Vortexer doucement pour mélanger.

Aliquoter **45 µl** de mélange mère (master mix) + la solution d'ADN polymérase dans chaque puits de réaction.

Ajouter **5 µl** de matrice appropriée dans chaque puits.

---

**Volume total de réaction = 50 µl**

## 7.4. Amplification

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

**Tableau 5.** Conditions de thermocyclage

Étape	Température	Durée	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 suivant 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 (nt) comporte un pic précurseur visible à 84 nt.

### Plateformes ABI 3100 et 3100 :

- 7.5.1. Dans un microtube à centrifuger propre, mélanger une quantité appropriée (10 µl par réaction PCR) de Formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille ROXa. Bien vortexer.
- 7.5.2. Dans une plaque PCR à 96 puits, ajouter 10 µl de Formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille ROX dans les puits individuels pour chaque réaction.
- 7.5.3. Transférer 1 µl de chaque réaction 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 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 3100/3130 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*)

#### Plateformes ABI 3500 :

- 7.5.9. Dans un microtube à centrifuger non utilisé, mélanger une quantité appropriée (9,5 µl par réaction) de Formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille LIZ. Bien vortexer.
- 7.5.10. Dans une plaque PCR à 96 puits, ajouter 9,5 µl de Formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille LIZ dans les puits individuels pour chaque réaction.
- 7.5.11. Transférer 0,5 µl de chaque réaction dans les puits contenant le Formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille LIZ.
- Ajouter un seul échantillon par puits.
  - Aspirer et expulser avec la pipette pour mélanger.
- 7.5.12. Reboucher 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*)

#### 7.6. Analyse des données

La feuille de calcul *TCRG* Algorithm (algorithme *TCRG*) a été développée dans le but d'analyser les résultats des données de *TCRG* V2.

- 7.6.1. Ouvrir la ***TCRG* Algorithm Worksheet (Feuille de Calcul de l'Algorithme *TCRG*)** (la feuille de calcul nécessite Microsoft Excel).
- 7.6.2. Ajouter toutes les données brutes dérivées de l'analyse par EC à un nouveau projet dans le logiciel *GeneMapper*.
- 7.6.3. Vérifier que l'**Analysis Method (Méthode d'Analyse)** sélectionnée est *Microsatellite Default (Microsatellite par Défaut)* et que le *Size Standard (Marqueur de Taille)* approprié est sélectionné.
- Il peut être nécessaire de réduire le seuil *Minimum Peak Height (Taille Minimum du Pic)* afin de détecter tous les pics dans une distribution gaussienne.
    - Pour ce faire, sélectionner **GeneMapper Manager (Gestionnaire de Cartographie Génétique)** dans le menu *Tools (Outils)*, aller dans l'onglet **Analysis Methods (Méthodes d'analyse)**, ouvrir l'**Analysis Method Editor (Éditeur de méthode d'analyse) Microsatellite Default (Microsatellite par défaut)**.
    - Aller dans l'onglet *Peak Detector (Détecteur de pic)*, sélectionner **User Specified (rfu) (Défini par l'utilisateur [rfu])**, et indiquer la hauteur de pic souhaitée pour le marqueur *Blue (bleu)*.
- 7.6.4. Dans le menu *Analysis (Analyse)*, sélectionner **Analyze (Analyser)**.
- 7.6.5. Pour chaque fichier d'échantillon analysé, ouvrir la courbe représentative associée.
- 7.6.6. Pour que la courbe représentative affiche uniquement le *Blue Dye (Marqueur Bleu)*, aller dans le menu **View (Afficher)** et sélectionner **Dyes → Blue Dye (Marqueurs → Marqueur Bleu)**.
- 7.6.7. Puis, dans le menu **View (Afficher)**, choisir **Tables → Sizing Table (Tableaux → Tableau des Tailles)**.
- Mettre en évidence les pics représentés sur la courbe dans l'intervalle attendu de *159 nt à 207 nt*.

- 7.6.8. Dans la partie *Sizing Table (Tableau des Tailles)*, copier les données de la colonne **Size (nt) (Taille [nt])** et **Height (RFU) (Hauteur [RFU])** pour les pics mis en évidence dans la plage de taille attendue.
- 7.6.9. Coller les données relatives à la taille et la hauteur de pic dans la partie non verrouillée de la feuille de calcul *TCRG Algorithm (algorithme TCRG)* (les cellules sont surlignées en gris).
- GeneMapper version 3.5 et précédentes nécessite de saisir ces données manuellement dans la feuille de calcul.
- 7.6.10. La feuille de calcul génère un résumé des valeurs de *RPR*, *D(x)* et *%RFU (max)* pour les cinq pics dont les valeurs sont les plus aberrantes par rapport à une distribution gaussienne normale.
- Si un pic du tableau récapitulatif répond aux critères correspondant au pic clonal définis dans la feuille de calcul *TCRG Algorithm (Algorithme TCRG)*, la colonne intitulée *Significant? (Significatif?)* affiche **Yes (Oui)**.
  - Si un pic du tableau récapitulatif ne répond pas aux critères correspondant au pic clonal définis dans la feuille de calcul *TCRG Algorithm (Algorithme TCRG)*, la colonne intitulée *Significant? (Significatif?)* affiche **No (Non)**.
- 7.6.11. Les critères suivants, ainsi que ceux appliqués dans la feuille de calcul, définissent des pics comme **Positive for Clonality (Positifs pour la Clonalité)** :
- L'analyse utilisant la feuille de calcul doit être accompagnée d'une confirmation visuelle afin de garantir que la feuille de calcul interprète l'échantillon correctement.
  - Les échantillons non clonaux présentent un fond polyclonal voisin de la distribution gaussienne des pics dans la plage de taille attendue. Les échantillons clonaux présentent généralement un fond polyclonal avec une distribution gaussienne dans la plage de taille attendue, dans laquelle un pic clonal suspecté se distingue comme une valeur aberrante par rapport à la distribution gaussienne.
  - Des pics d'épaule sont susceptibles d'accompagner les pics clonaux suspectés. Un pic d'épaule est défini comme un pic de 1 nt en amont ou en aval du pic clonal suspecté : dont la taille est inférieure à celle du pic significatif suspecté voisin, mais supérieure à la distribution de fond. Les pics d'épaule peuvent également être reliés à des pics clonaux suspectés au-dessus de la ligne de base. Les pics d'épaule sont généralement considérés comme du bruit de fond et ne doivent pas être évalués comme des pics clonaux suspectés.
  - La valeur *D(x)* du pic clonal suspecté, d'après la formule figurant dans la partie verrouillée de la feuille de calcul, doit être  $\geq 0,0419$ .
  - Le *RPR (RPR)* du pic clonal suspecté (calculé en divisant la hauteur du pic clonal suspecté par la hauteur du plus petit pic voisin) doit être  $\geq 4,0X$ .
  - La *RFU (RFU)* du pic clonal suspecté doit être  $\geq 20 \%$  de la RFU du pic le plus haut dans cet échantillon.
  - Si le pic clonal suspecté répond à ces critères (défini dans la feuille de calcul comme "Significant" ("Significatif"), le pic est positif pour la clonalité.
  - Une différence  $\geq 2$  nt est nécessaire entre deux pics clonaux positifs.
  - Les échantillons doivent être analysés en double afin de confirmer que les analyses répétées montrent des résultats positifs pour un pic suspecté.
  - La taille des pics clonaux suspectés dans les deux analyses répétées doit être comprise dans la plage  $\pm 1$  nt par rapport à chacun.

## 7.7. Contrôle qualité

Des contrôles positifs et négatifs sont fournis dans le kit et doivent être inclus dans chaque analyse. En outre, un contrôle négatif sans ADN (par ex., eau) doit également être inclus. Un contrôle tampon peut aussi être ajouté afin de garantir l'absence de contamination du tampon employé pour remettre en suspension les échantillons. Les valeurs des contrôles positifs sont fournies dans la section 10.1 *Taille attendue des produits amplifiés*. Des contrôles supplémentaires et des contrôles de sensibilité (dilutions des contrôles positifs dans notre contrôle négatif) sont disponibles auprès d'Invivoscribe.

## 7.8. Contrôle du test

Les tailles des amplicons figurant dans le Tableau 4 ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI. Les tailles d'amplicons mesurées sur votre instrument d'électrophorèse capillaire spécifique peuvent différer de 1 à 4 nucléotides (nt) de celles figurant ci-après selon la plateforme de détection et la version du logiciel d'analyse utilisé. Une fois identifiée, la taille de l'amplicon déterminée sur votre plateforme spécifique sera uniforme d'une analyse à l'autre.

**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.

**Tableau 6.** Contrôle du test

Mélange mère	Cible	Couleur	ADN contrôle	N° de référence	Taille du produit (nt)	Résultats de l'algorithme attendus
<b>TCRG - 6FAM</b>	V $\gamma$ 1-V $\gamma$ 11 + J $\gamma$ 1/J $\gamma$ 2, J $\gamma$ P, J $\gamma$ P1/J $\gamma$ P2	<b>Bleu</b>	<b>Plage de taille spécifiée</b> 5% TCRG Positive Control DNA (ADN contrôle positif TCRG 5 %)	--- 40883320	<b>159-207</b> 194, 196	Un pic à 196 nt signalé comme « significatif »
<b>Specimen Control Size Ladder (Marqueur de Taille Contrôle)</b>	Différents gènes	<b>Bleu</b>	TCRG Negative Control DNA (ADN contrôle négatif TCRG)	40920020	84, 96, 200, 300, 400, 600 <sup>a</sup> :	S.O. (sans objet)

<sup>a</sup>**Remarque :** dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'obtenir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 600 nt. Pour la détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI, le pic de 600 nt peut ne pas apparaître au cours des durées de réaction normales. En outre, la taille de ce pic peut différer de 30 nt lorsque la taille du fragment est extrapolée à l'aide des marqueurs de taille GeneScan - 400HD [ROX].

## 8. Interprétation des résultats

Bien que des résultats positifs soient une forte indication de tumeur maligne, les résultats positifs et négatifs doivent être interprétés en tenant compte de toutes les informations cliniques et des résultats des analyses biologiques. La plage de taille attendue pour le mélange mère (master mix) *TCRG* – 6FAM a été déterminée comme s'étendant de 159 nt à 207 nt en analysant les échantillons contrôles négatifs et positifs. Toutefois, des réarrangements clonaux du gène gamma *TCR* peuvent se produire en dehors de la plage de taille spécifiée. Le ou les produits suspectés d'être des réarrangements clonaux du gène gamma *TCR* situés en dehors de la plage de taille spécifiée peuvent être séquencés afin de confirmer leur identité.

### 8.1. Analyse

- 8.1.1. Signaler les échantillons pour lesquels l'amplification échoue après des analyses répétées comme « **Aucun résultat ne peut être fourni concernant cet échantillon, car il contenait de l'ADN en quantité ou qualité insuffisante pour l'analyse** ».
- 8.1.2. Répéter l'analyse en cas d'échec de la réaction du contrôle positif ou négatif.
- 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. **Examiner tous les contrôles des tests 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 ainsi que les décisions nécessaires en fonction des résultats.

Type de contrôle	Résultat attendu	Résultat aberrant
<b>Contrôle négatif sans ADN</b>	Aucune amplification : continuer l'analyse.	Amplification présente : rechercher une éventuelle contamination et répéter le test.
<i>TCRG</i> Negative Control ( <b>ADN contrôle négatif <i>TCRG</i></b> )	Distribution gaussienne normale de 159 nt à 207 nt. Aucun pic clonal n'est signalé dans la feuille de calcul de l'algorithme. Continuer l'analyse.	La feuille de calcul de l'algorithme signale un ou plusieurs pics comme étant « significatifs » : répéter le test.
<b>5% <i>TCRG</i> Positive Control (Contrôle positif <i>TCRG</i> 5 %)</b> (Peut aussi être un contrôle d'extraction si le matériel du contrôle positif est prélevé par un procédé d'extraction.)	Pics présents à 194 nt, 196 nt. La feuille de calcul de l'algorithme signale au moins le pic de 196 nt comme étant « significatif ». Le pic de 194 nt peut être ou non identifié comme étant « significatif ». Continuer l'analyse.	La feuille de calcul de l'algorithme ne signale aucun pic de 196 nt comme étant « significatif » : répéter le test.
<b>Specimen Control Size Ladder (Marqueur de Taille Contrôle)</b>	Si les pics de 100, 200, 300 et 400 nt sont observés, continuer l'analyse. Dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'obtenir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 600 nt.	Si aucun pic n'est détecté, répéter le test <u>sauf si l'échantillon est positif</u> . Si seuls les pics de 100, 200 ou 300 nt sont visibles, évaluer de nouveau l'échantillon afin de détecter une éventuelle dégradation de l'ADN <u>sauf si l'échantillon est positif</u> .

### 8.2. Interprétation de l'échantillon

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

- 8.2.1. Un ou deux pics significatifs mis en évidence par la feuille de calcul de l'algorithme compris dans la plage de taille attendue sont signalés comme suit : « **Positif pour la détection de réarrangement(s) clonal(aux) de gène 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.** »
- 8.2.2. Au moins trois pics significatifs mis en évidence par la feuille de calcul de l'algorithme compris dans la plage de taille attendue sont signalés comme suit : « **Les réarrangements clonaux de gène de la chaîne gamma des récepteurs des lymphocytes T correspondent à la détection d'une biclonalité ou d'une oligoclonalité.** »
- 8.2.3. L'absence de pics significatifs mis en évidence par la feuille de calcul de l'algorithme compris dans la plage de taille attendue est signalée comme suit : « **Négatif pour la détection de réarrangement(s) clonal (aux) de gène de la chaîne gamma des récepteurs des lymphocytes T.** »

**Remarque :** Effectuer une confirmation visuelle afin de vérifier que l'électrophérogramme et l'algorithme concordent.

## 9. Limites de la procédure

- Ce test n'identifie pas 100 % des populations cellulaires clonales.
- Ce test ne peut détecter de manière fiable moins de 5 cellules positives pour 100 cellules totales.
- Toujours interpréter les résultats des tests de clonalité moléculaire dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.
- L'algorithme nécessite un fond du signal qui soit raisonnablement constant et que les données soient saisies correctement. Des disparités du fond peuvent entraîner une reconnaissance incorrecte de l'échantillon par l'algorithme. Examiner tous les électrophérogrammes dans le but de confirmer la validité de l'interprétation.
- 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 indiquées 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 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 uniforme d'une analyse à l'autre. Cette reproductibilité est extrêmement utile pour surveiller la récurrence de la maladie.

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

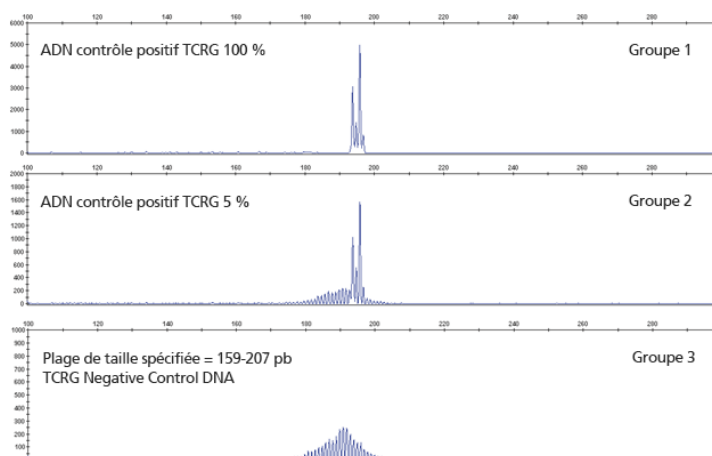
**Tableau 8.** Taille attendue des produits amplifiés

Mélange mère	Cible	Couleur	ADN contrôle	N° de référence	Taille du produit (nt)	Résultats de l'algorithme attendu
<b>TCRG-6FAM</b>	Tous gènes V et J V $\gamma$ 9, V $\gamma$ 10 + J $\gamma$ 1/J $\gamma$ 2	<b>Bleu</b> <b>Bleu</b>	<b>Plage de taille spécifiée</b> ADN contrôle négatif <i>TCRG</i> ADN contrôle positif <i>TCRG</i> 5 %	--- 40920020 40883320	<b>159 - 207</b> 159 - 207 194, 196	Aucun pic significatif Pic significatif à 196 nt et éventuel second pic à 194 nt
<b>Specimen Control Size Ladder (Marqueur de Taille Contrôle)</b>	Différents gènes	<b>Bleu</b>	Tout ADN humain	---	84, 96, 200, 300, 400, 600 <sup>a</sup>	S.O. (sans objet)

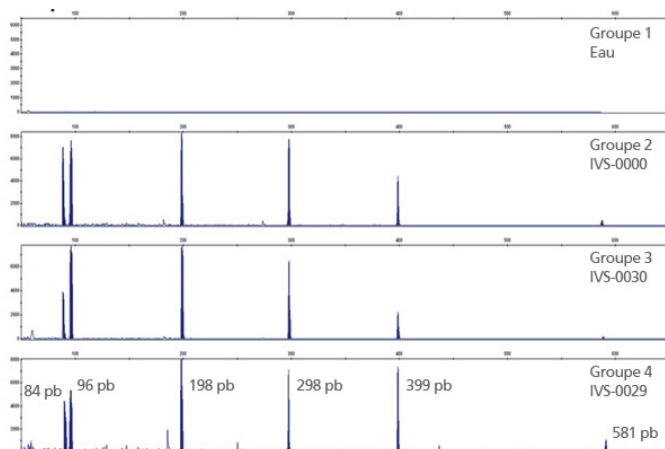
**\*Remarque :** dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'obtenir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 600 nt. Pour la détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI, le pic de 600 nt peut ne pas apparaître au cours des durées de réaction normales. En outre, la taille de ce pic peut différer de 30 nt lorsque la taille du fragment est extrapolée à l'aide des marqueurs de taille GeneScan - 400HD [ROX].



## 10.2. Données de l'échantillon



**Figure 2.** Les données figurant ci-dessous ont été obtenues avec le mélange mère (master mix) *TCRG-6FAM*. Les produits amplifiés ont été analysés sur un instrument ABI.



**Figure 3.** Les données ont été obtenues avec le mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder (Marqueur de Taille Contrôle)

## 11. Caractéristiques de performance

Le test a été en mesure de détecter des réarrangements clonaux dans 11 lignées de cellules contrôle positives.

**Tableau 9.** Les lignées de lymphocytes T leucémiques bien caractérisés suivantes, connus pour présenter un résultat positif de réarrangements *TCRG*, ont été analysées avec le mélange mère (master mix) *TCRG-6FAM* et les résultats sont présentés ci-dessous. Deux pics majeurs ont été détectés dans chacune des lignées de cellules.

Lignée de cellules	Numéro de référence IVS	Pic 1 (nt)	Pic 2 (nt)
IVS-0004 100 %	4-088-0190	178,8	187,9
IVS-0005 100 %	4-088-0250	173,0	198,3
IVS-0008 100 %	4-088-0430	195,1	206,7
IVS-0009 100 %	4-088-0490	187,8	190,5
IVS-0016 100 %	4-088-0910	169,4	193,7
IVS-0021 100 %	4-088-1210	183,1	188,0
IVS-0039 100 %	4-088-2290	193,9	195,9
DND-41	S.O. (sans objet)	168,9	188,8
PF-382	S.O. (sans objet)	190,6	200,1
MOLT-13	S.O. (sans objet)	187,9	190,6



**Tableau 10.** Le test a présenté des résultats sensibles lors de l'analyse avec l'ADN IVS-0039 (200 ng/μl) dilué dans l'ADN d'amygdale (200 ng/μl) à 5 %, 10 %, 25 %, 50 % et 75 % (v/v).

		Pic 1				Pic 2			
		Product Size (Taille du produit) (nt)	D(x) Value (Valeur D(x))	RPR Ratio (Rapport RPR)	Significant? (Significatif ?)	Product Size (Taille du Produit) (nt)	D(x) Value (Valeur D(x))	RPR Ratio (Rapport RPR)	Significant? (Significatif ?)
IVS-0039 5 %	rép. 1	196,20	0,2330	6,04	Oui	194,16	0,1208	2,93	Non
	rép. 2	195,81	0,1803	5,32	Oui	193,75	0,0993	2,65	Non
	rép. 3	195,71	0,1872	6,68	Oui	193,65	0,0962	2,45	Non
	rép. 4	196,18	0,2080	6,34	Oui	194,09	0,0941	2,88	Non
	rép. 5	195,79	0,1833	6,07	Oui	193,77	0,0931	2,70	Non
IVS-0039 10 %	rép. 1	196,24	0,3573	9,76	Oui	194,31	0,2115	5,15	Oui
	rép. 2	196,15	0,3382	9,18	Oui	193,95	0,1877	4,03	Oui
	rép. 3	195,66	0,2790	8,32	Oui	193,62	0,1819	4,24	Oui
	rép. 4	196,15	0,3382	9,18	Oui	193,95	0,1877	4,03	Oui
	rép. 5	195,80	0,2983	7,77	Oui	193,75	0,1830	4,69	Oui
IVS-0039 25 %	rép. 1	196,02	0,3947	8,00	Oui	194,16	0,3730	22,2	Oui
	rép. 2	196,11	0,3216	6,07	Oui	194,17	0,3568	20,09	Oui
	rép. 3	195,72	0,4059	9,39	Oui	193,66	0,3451	17,02	Oui
	rép. 4	196,11	0,3212	6,07	Oui	194,17	0,3561	20,09	Oui
	rép. 5	195,71	0,4316	10,24	Oui	193,65	0,3482	17,09	Oui
IVS-0039 50 %	rép. 1	196,15	0,2939	4,58	Oui	194,23	0,4545	630,3	Oui
	rép. 2	195,67	0,3817	7,31	Oui	193,69	0,4686	120,4	Oui
	rép. 3	195,66	0,4503	9,17	Oui	193,62	0,4672	28,15	Oui
	rép. 4	196,07	0,3586	5,73	Oui	194,11	0,4607	32,59	Oui
	rép. 5	195,67	0,4404	8,85	Oui	193,69	0,4626	124,4	Oui
IVS-0039 75 %	rép. 1	196,11	0,2387	3,36	Non	193,89	0,3532	58,40	Oui
	rép. 2	195,72	0,3154	5,29	Oui	193,66	0,4799	71,81	Oui
	rép. 3	195,62	0,4520	9,16	Oui	193,57	0,4811	110,9	Oui
	rép. 4	196,15	0,2911	4,45	Oui	194,14	0,4387	79,15	Oui
	rép. 5	195,71	0,3301	5,86	Oui	193,65	0,4708	78,47	Oui

**Tableau 11.** Combiné à la feuille de calcul *TCRG* Algorithm (Algorithme *TCRG*), le test était en mesure de détecter l'ADN de 6 lignées de cellules contrôles (200 ng/μl) diluées dans l'ADN d'amygdale (200 ng/μl) à 5 % (v/v) et les résultats sont présentés ci-dessous.

		Pic 1				Pic 2			
		Product Size (Taille du produit) (nt)	D(x)	RPR Ratio (Rapport RPR)	Significant? (Significatif ?)	Product Size (Taille du produit) (nt)	D(x)	RPR Ratio (Rapport RPR)	Significant? (Significatif ?)
IVS-0004 5 %	rép. 1	178,87	0,2964	42,50	Oui	184,69	0,1322	5,61	Oui
	rép. 2	184,36	0,1193	27,59	Oui	178,39	0,0908	21,13	Oui
	rép. 3	184,32	0,1266	22,96	Oui	178,32	0,1041	23,93	Oui
	rép. 4	184,69	0,1200	14,97	Oui	178,78	0,1009	29,82	Oui
	rép. 5	184,36	0,1342	12,12	Oui	178,40	0,1146	32,07	Oui
IVS-0016 5 %	rép. 1	169,38	0,1035	115,9	Oui	193,71	0,1016	2,32	Non
	rép. 2	169,03	0,0918	159,0	Oui	193,50	0,0857	2,24	Non
	rép. 3	168,99	0,0975	55,00	Oui	193,41	0,0791	2,25	Non
	rép. 4	169,38	0,1028	100,9	Oui	193,77	0,1041	2,45	Non
	rép. 5	169,00	0,0957	55,0	Oui	193,53	0,0944	2,50	Non
IVS-0021 5 %	rép. 1	187,91	0,1120	7,28	Oui	182,92	0,1239	14,57	Oui
	rép. 2	187,58	0,1003	5,67	Oui	182,53	0,1298	14,23	Oui
	rép. 3	182,50	0,0950	35,5	Oui	187,50	0,1110	5,54	Oui
	rép. 4	187,92	0,1112	6,99	Oui	183,01	0,1238	12,68	Oui
	rép. 5	187,62	0,0978	6,09	Oui	182,67	0,1253	24,69	Oui
IVS-0039 5 %	rép. 1	195,97	0,2907	8,46	Oui	193,95	0,1576	3,60	Non
	rép. 2	195,70	0,2221	6,74	Oui	193,59	0,1321	3,04	Non
	rép. 3	195,56	0,2010	6,86	Oui	193,53	0,1244	2,84	Non
	rép. 4	196,01	0,2942	8,05	Oui	194,01	0,1484	3,18	Non
	rép. 5	195,71	0,2513	7,53	Oui	193,65	0,1470	3,36	Non
PF-382 5 %	rép. 1	191,84	0,2784	5,77	Oui	158,41	0,3057	123,5	Oui
	rép. 2	191,48	0,2558	5,30	Oui	158,24	0,2739	125,7	Oui
	rép. 3	191,57	0,2418	5,44	Oui	158,15	0,2787	115,1	Oui
	rép. 4	191,84	0,2822	5,68	Oui	158,33	0,2811	118,8	Oui
	rép. 5	191,55	0,2524	5,63	Oui	158,15	0,2883	93,0	Oui
MOLT-13 5 %	rép. 1	190,74	0,2147	3,97	Non	187,92	0,1292	6,96	Oui
	rép. 2	190,46	0,1806	3,51	Non	187,60	0,1081	4,96	Oui
	rép. 3	190,46	0,1731	3,42	Non	187,53	0,1039	5,27	Oui
	rép. 4	190,64	0,2132	4,10	Oui	187,93	0,1215	5,69	Oui
	rép. 5	190,46	0,1983	6,19	Oui	187,57	0,1114	5,80	Oui

**Remarque :** IVS-0004 5 % correspond à [REF](#) 40880230, IVS-0016 5 % correspond à [REF](#) 40880950, IVS-0021 5 % correspond à [REF](#) 40881250 et IVS-0039 5 % correspond à [REF](#) 40882330.

Les résultats du test *TCRG* V2 ont été comparés au séquençage 454 de Roche destiné à la détection des réarrangements clonaux du gène gamma des récepteurs des lymphocytes T. Pour le séquençage 454, toute séquence d'ADN qui était présente dans une proportion supérieure à 5 % du nombre de séquences total détecté était considérée comme un événement clonal. Si plus de deux (2) séquences dépassaient le seuil de 5 %, cet échantillon était défini comme oligoclonal. Le test *TCRG* V2 présentait une

concordance de 100 % pour les sept (7) échantillons dont la clonalité a été identifiée par séquençage. Il y avait une concordance de 75 % pour les douze (12) échantillons négatifs pour la détection d'un événement clonal ou d'oligoclonalité. Les types d'échantillons étaient notamment des échantillons de sang périphérique, de moelle osseuse et fixés au formol et inclus dans la paraffine (FFIP). Il est important de noter que la présence ou l'absence de pics clonaux dans un échantillon clinique n'est pas toujours corrélée à des résultats cliniques réels.

## 12. 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, Californie 92121-2711  
États-Unis

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

### Fabricant Représentant agréé et assistance technique UE

**EC|REP** Invivoscribe, Inc  
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  
Service technique : support@invivoscribe.com  
Service client : sales-eu@invivoscribe.com  
Site Internet : www.invivoscribe.com  
Heures d'ouverture : 7 h - 17 h heure française

## 13. Bibliographie

1. Miller, JE, et al., An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Mol. Diag.* 1999, 4(2):101-117.

## 14. Symboles

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



Destiné au diagnostic *in vitro*



Date de péremption



Numéro de référence



Représentant agréé dans la Communauté européenne



Volume du réactif



Fabricant



Numéro de lot



Consulter les instructions d'utilisation



Conditions de conservation

## 15. Informations légales

### 15.1. Garantie et responsabilité

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

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

### 15.2. Brevets et marques

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

IdentiClone® est une marque déposée d'Invivoscribe®.

©2021 Invivoscribe, Inc. Tous droits réservés. Les marques commerciales mentionnées dans ce document sont la propriété d'Invivoscribe, Inc. et/ou de ses filiales, ou (en ce qui concerne les marques commerciales d'autres détenteurs figurant dans ce document) de leurs propriétaires respectifs.

### 15.3. Avis à l'acheteur – ADN polymérase EagleTaq UNIQUEMENT

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