



BCL2 oligomix Alert kit

recherche de l'ADN BCL2-IgH MBR et mcr

REF BANG08-02

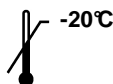


TABLE DES MATIÈRES

APPLICATION	Page 1
PRINCIPE DU TEST	Page 2
DESCRIPTION	Page 2
MATÉRIEL FOURNI	Page 3
MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI	Page 4
AUTRES PRODUITS REQUIS	Page 4
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	Page 4
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 6
PROCÉDURE	Page 7
LIMITES DE LA PROCÉDURE	Page 13
CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES	Page 14
BIBLIOGRAPHIE	Page 15
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	Page 16
LÉGENDE DES SYMBOLES	Page 18

APPLICATION

Le produit «**BCL2 oligomix Alert kit**» est un test qualitatif d'amplification des acides nucléiques pour la recherche de l'ADN du transcrit BCL2-IgH, translocation t(14;18), variantes MBR et mcr dans l'ADN extrait d'échantillons de sang périphérique prélevé sur EDTA, sang médullaire prélevé sur EDTA ou sodium citrate et échantillons biopsiques frais et congelés.

Ce produit est utilisé, conjointement aux données cliniques et à d'autres examens de laboratoire, dans le diagnostic et le monitoring de la maladie minimum résiduelle chez les patients affectés de lymphome folliculaire ou de lymphome à grandes cellules.

BCL2 oligomix Alert kit

recherche de l'ADN BCL2-IgH MBR et mcr

REF BANG08-02

PRINCIPE DU TEST

La procédure prévoit l'exécution de trois types de réactions d'amplification, MBR, mcr et ABL, avec un thermostat programmable (thermocycleur).

La réaction MBR prévoit deux réactions successives d'amplification (nested) spécifiques du transcrit BCL2-IgH, variante MBR (MBR).

La réaction mcr prévoit deux réactions successives d'amplification (nested) spécifiques du transcrit BCL2-IgH, variante mcr (mcr).

La réaction ABL prévoit une seule réaction d'amplification (single round) spécifique du gène ABL (ABL), utilisée comme contrôle de conformité de l'échantillon.

Dans le cas des réactions MBR et mcr, une première réaction d'amplification spécifique d'une région du transcrit BCL2-IgH est menée dans le premier tube à partir de l'ADN extrait des échantillons étudiés. Une seconde réaction d'amplification spécifique du transcrit est menée dans le second tube à partir du produit de la première réaction d'amplification.

La présence des produits spécifiques de la seconde réaction d'amplification indique la présence de l'ADN du transcrit BCL2-IgH dans l'échantillon initial.

Dans le cas de la réaction ABL, la réaction d'amplification spécifique d'une région du gène ABL est menée dans le tube à partir du produit de la première réaction d'amplification.

La présence du produit spécifique d'amplification de contrôle indique la présence de l'ADN du gène ABL dans l'échantillon initial.

DESCRIPTION

Le kit fournit les composants suivants :

MBR OligoMIX et mcr OligoMIX de première amplification

Mélanges optimisés de réactifs pour l'amplification des acides nucléiques en solution de stabilisation, **pré-aliquotés en tubes «monotest» prêts à l'emploi**. Chaque tube contient 40 µL de solution et 50 µL d'huile de vaseline.

MBR OligoMIX est aliquoté en tubes «*monotest*» BLEUS.

mcr OligoMIX est aliquoté en tubes «*monotest*» NEUTRES.

Les mélanges de réactifs fournissent les oligonucléotides d'amorçage de la première amplification, le système tampon, le chlorure de magnésium et les nucléotides triphosphates.

Dans le cas **MBR OligoMIX**, les oligonucléotides d'amorçage sont spécifiques des régions génomiques **MBR** et **IgH**.

Dans le cas de **mcr OligoMIX**, les oligonucléotides d'amorçage sont spécifiques des régions génomiques **mcr** et **IgH**.

MBR OligoMIX et mcr OligoMIX de seconde amplification

Mélanges optimisés de réactifs pour l'amplification des acides nucléiques en solution de stabilisation, **pré-aliquotés en tubes «monotest» prêts à l'emploi**. Chaque tube contient 44 µL de solution et 50 µL d'huile de vaseline.

MBR OligoMIX est aliquoté en tubes «*monotest*» ROUGES.

mcr OligoMIX est aliquoté en tubes «*monotest*» VERTS.

Les mélanges de réactifs fournissent les oligonucléotides d'amorçage de la seconde amplification, le système tampon, le chlorure de magnésium et les nucléotides triphosphates.

Dans le cas de **MBR OligoMIX**, les oligonucléotides d'amorçage sont spécifiques des régions génomiques **MBR** et **IgH**.

Dans le cas de **mcr OligoMIX**, les oligonucléotides d'amorçage sont spécifiques des régions génomiques **mcr** et **IgH**.

ABL OligoMIX pour l'amplification de contrôle

Un mélange optimisé de réactifs pour l'amplification des acides nucléiques en solution de stabilisation, **pré-aliquoté en tubes «monotest» JAUNES prêts à l'emploi**. Chaque tube contient 40 µL de solution et 50 µL d'huile de vaseline.

Le mélange de réactifs fournit les oligonucléotides d'amorçage de l'amplification de contrôle, le système tampon, le chlorure de magnésium et les nucléotides triphosphates.

Les oligonucléotides d'amorçage sont spécifiques du gène **ABL**.

Le kit permet d'effectuer **25 réactions**, contrôles positifs et négatifs inclus.

MATÉRIEL FOURNI

Composant	Description	Quantité	Composition	Étiquetage
MBR OligoMIX de première amplification	mélange d'amplification en tubes BLEUS de 0,2 mL.	25 x 90 µL	Oligonucléotides externes, chlorure de potassium, TRIS base, TRIS chlorhydrate, Triton X-100, Chlorure de magnésium, Désoxynucléotides triphosphates, huile de vaseline.	-
mcr OligoMIX de première amplification	mélange d'amplification en tubes NEUTRES de 0,2 mL.	25 x 90 µL	Oligonucléotides externes, chlorure de potassium, TRIS base, TRIS chlorhydrate, Triton X-100, Chlorure de magnésium, Désoxynucléotides triphosphates, huile de vaseline.	-
ABL OligoMIX amplification de contrôle	mélange d'amplification en tubes JAUNES de 0,2 mL.	25 x 90 µL	Oligonucléotides, chlorure de potassium, TRIS base, TRIS chlorhydrate, Triton X-100, Chlorure de magnésium, Désoxynucléotides triphosphates, huile de vaseline.	-
MBR OligoMIX de seconde amplification	mélange d'amplification en tubes ROUGES de 0,2 mL.	25 x 94 µL	Oligonucléotides internes, chlorure de potassium, TRIS base, TRIS chlorhydrate, Triton X-100, Chlorure de magnésium, Désoxynucléotides triphosphates, huile de vaseline.	-
mcr OligoMIX de seconde amplification	mélange d'amplification en tubes VERTS de 0,2 mL.	25 x 94 µL	Oligonucléotides internes, chlorure de potassium, TRIS base, TRIS chlorhydrate, Triton X-100, Chlorure de magnésium, Désoxynucléotides triphosphates, huile de vaseline.	-

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.
- Gants sans poudre, jetables en latex ou équivalent.
- Microcentrifugeuse de paillasse (12.000 - 14.000 Tr/min).
- Micro pipettes et embouts stériles avec filtre pour aérosol ou à distribution positive (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL).
- Eau bi-distillée stérile.
- Thermostat programmable (thermocycleur).

AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction de l'ADN des échantillons à analyser, pour le contrôle positif d'amplification et pour la révélation de l'ADN, **ne sont pas** compris dans ce kit. Pour procéder à ces phases d'analyse, il est conseillé d'utiliser les kits accessoires suivants fabriqués par ELITechGroup S.p.A.:

«**EXTRAcCell**» (code EXT02), kit d'extraction de l'ADN à partir d'échantillons cellulaires ; le kit permet d'effectuer 50 extractions.

«**EXTRAffin**» (code EXTF01), kit d'extraction d'acides nucléiques à partir d'échantillons biopsiques ; le kit permet d'effectuer 50 extractions.

«**BCL2 - Positive Control**» (code CTRG08), contrôle positif d'amplification d'ADN plasmidique ; le contrôle fourni dans le kit permet de réaliser 25 étapes.

«**DNA polymerase 2U / µL**» (code ER40 et ER140), enzyme ADN polymérase thermostable pour l'amplification des acides nucléiques, qui permet d'effectuer 125 réactions.

«**ELECTROPHORESIS 3**» (code EPH03), révélation de l'ADN amplifié par électrophorèse sur gel d'agarose, qui permet d'effectuer 120 révélations.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Ce kit est réservé uniquement à l'usage *in vitro*.

Avertissements et précautions

Manipuler et éliminer tous les échantillons biologiques comme s'ils pouvaient transmettre des agents infectieux. Éviter le contact direct avec les échantillons biologiques. Éviter les éclaboussures ou les aérosols. Le matériel qui entre en contact avec les échantillons biologiques doit être décontaminé à l'hypochlorite de sodium à 3% pendant un temps minimum de 30 minutes ou autoclavé à 121°C pendant une heure avant d'être éliminé.

Manipuler et éliminer tous les réactifs et tous les matériels utilisés pour le test comme s'ils pouvaient transmettre des agents infectieux. Éviter le contact direct avec les réactifs. Éviter les éclaboussures ou les aérosols. Les déchets doivent être traités et éliminés conformément aux normes de sécurité. Le matériel jetable combustible doit être incinéré. Les déchets liquides contenant des acides ou des bases doivent être neutralisés avant leur élimination.

Porter des vêtements de protection et des gants et protéger les yeux ou le visage.
Ne jamais pipeter les solutions à la bouche.
Ne pas manger, boire, fumer ni se maquiller dans l'environnement de travail.
Se laver parfaitement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs.
Éliminer les réactifs en surplus et les déchets en respectant les réglementations en vigueur.
Lire toutes les instructions fournies dans le kit avant de procéder au test.
Respecter scrupuleusement les consignes fournies dans le kit pendant l'exécution du test.
Respecter la date de péremption du kit.
N'utiliser que les réactifs présents dans le kit et ceux conseillés par le producteur.
Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.
Ne pas utiliser de réactifs provenant de kits d'autres fabricants.

Avertissements et précautions à adopter en biologie moléculaire

Les procédures de biologie moléculaire, comme l'extraction, la transcription inverse, l'amplification et la révélation d'acides nucléiques doivent être exécutées par un personnel ayant reçu une formation appropriée afin d'éviter tout risque de résultats erronés dus en particulier à la dénaturation des acides nucléiques ou à la contamination des échantillons par des produits d'amplification.

Il est nécessaire de disposer de zones distinctes pour l'extraction / préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification / révélation des produits d'amplification. Ne jamais introduire un produit d'amplification dans la zone d'extraction / préparation des réactions d'amplification.

Il est nécessaire de disposer de blouses, gants et instruments dédiés pour l'extraction / préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification / révélation des produits d'amplification. Ne jamais transférer les blouses, gants et instruments de la zone dédiée à l'amplification / révélation des produits d'amplification vers la zone dédiée à l'extraction / préparation des réactions d'amplification.

Les échantillons ne doivent être utilisés que pour ce type d'analyse. Les échantillons doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les tubes contenant des échantillons différents ne doivent jamais être ouverts simultanément. Les pipettes utilisées pour manipuler les échantillons ne doivent servir qu'à cet usage exclusif. Les pipettes doivent être du type à distribution positive ou utiliser des embouts à filtre pour aérosol. Les embouts utilisés doivent être stériles, dépourvus de DNase et RNase, dépourvus d'ADN et ARN.

Les réactifs doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les réactifs nécessaires à l'amplification doivent être préparés de façon à être utilisés en une seule étape de travail. Les pipettes utilisées pour manipuler les réactifs ne doivent servir qu'à cet usage exclusif. Les pipettes doivent être de type à distribution positive ou utiliser des embouts à filtre pour aérosol. Les embouts utilisés doivent être stériles, dépourvus de DNase et RNase, dépourvus d'ADN et ARN.

Les produits d'amplification doivent être manipulés de façon à en limiter le plus possible la dispersion dans l'environnement afin d'éviter tout risque de contamination. Les pipettes utilisées pour manipuler les produits d'amplification ne doivent servir qu'à cet usage exclusif.

Avertissements et précautions concernant les composants

Les tubes contenant les **OligoMIX** pour la **première** et la **seconde amplification** et pour l'**amplification de contrôle** sont jetables et ils ne doivent donc être utilisés qu'une seule fois pour des réactions d'amplification.

L'utilisation des **OligoMIX** pour la **première** et pour la **seconde amplification** et pour l'**amplification de contrôle** implique les conseils de prudence suivants (S):

S 23-25. Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols. Éviter le contact avec les yeux.

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec de l'ADN extrait des échantillons biologiques suivants : sang périphérique prélevé sur EDTA, sang médullaire prélevé sur EDTA ou sodium citrate, et échantillons biopsiques frais et congelés.

Sang périphérique prélevé sur EDTA et sang médullaire prélevé sur EDTA ou sodium citrate

Le sang périphérique prélevé sur EDTA, ou sang médullaire prélevé sur EDTA ou sodium citrate destiné à l'extraction de l'ADN, doit être prélevé selon les indications du laboratoire, transporté à +2° / +8°C et conservé à +2° / +8°C pendant trois jours maximum.

Ne pas congeler le sang périphérique ou médullaire de façon à éviter la perte de l'ADN.

Les instructions pour l'extraction de l'ADN sont fournies dans la Notice d'instructions et d'utilisation du kit «**EXTRAcell**».

Échantillons biopsiques frais et congelés

Les échantillons biopsiques frais destinés à l'extraction de l'ADN doivent être prélevés suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2° / +8°C et conservés à +2° / +8°C pendant un maximum de 4 heures. Ils peuvent être congelés et conservés à -20°C pendant un maximum de trente jours ou à -70°C pendant un temps plus long.

Il est conseillé de subdiviser en fragments d'environ 1 mm³ les échantillons à conserver congelés de façon à ne pas les soumettre à des cycles répétés de congélation / décongélation.

Les instructions pour l'extraction de l'ADN sont fournies dans la Notice d'instructions et d'utilisation du kit «**EXTRAffin**».

Substances interférentes

L'ADN extrait de l'échantillon initial ne doit pas contenir d'héparine ni d'hémoglobine afin d'éviter des phénomènes d'inhibition et des résultats erronés trop fréquents.

Aucune donnée n'est disponible concernant les éventuels phénomènes d'inhibition par des médicaments antibiotiques, antiviraux, chimiothérapeutiques ou immunosuppresseurs.

Contrôles d'amplification

Chaque étape d'amplification doit impérativement être validée en préparant une réaction de contrôle négatif et une réaction de contrôle positif.

Pour le contrôle négatif, utiliser de l'eau bi-distillée stérile (non comprise dans le kit) à ajouter à la réaction à la place de l'ADN extrait de l'échantillon.

Pour le contrôle positif utiliser le produit «**BCL2 - Positive Control**».

Contrôles de la qualité

Il est conseillé de valider toute la procédure d'analyse de chaque session, extraction et amplification, en utilisant un échantillon négatif et un échantillon positif déjà testés ou du matériel de référence calibré.

PROCÉDURE

Paramétrage du cycle de température

(À effectuer dans la zone d'amplification / révélation des produits d'amplification)

Avant de lancer l'étape, il est nécessaire de :

- Vérifier que le bloc thermique du thermostat programmable (thermocycleur) soit compatible avec le format des tubes «*monotest*» fournis dans le kit (tubes de 0,2 mL).
- Vérifier, en consultant la documentation de l'instrument, le mode de contrôle de la température adopté par le thermocycleur pour l'exécution du cycle de température.
- Lorsque cela est possible, sélectionner le système de **contrôle de température directement sur le bloc thermique** (par exemple thermocycleur Hybaid™ ou Eppendorf™).
- Lorsque cela n'est pas possible, (par exemple thermocycleur GeneAmp PCR System d'Applied Biosystems™) utiliser le mode de contrôle de la température prédéterminé.
- Lorsque cela est demandé, paramétrer le volume de réaction à **100 µL** sur le thermocycleur.
- Configurer le thermocycleur avec les paramètres du cycle de température indiqués dans les tableaux suivants.

Cycle de température de la première amplification		
Nombre de cycles	Températures	Temps
1 cycle	95° C	4 min.
35 cycles	95° C	1 min.
	60° C	1 min.
	72° C	1 min.
1 cycle	72° C	5 min.

Cycle de température de la seconde amplification		
Nombre de cycles	Températures	Temps
1 cycle	95° C	2 min.
30 cycles	95° C	1 min.
	60° C	1 min.
	72° C	1 min.
1 cycle	72° C	5 min.

Préparation de la première amplification

(À effectuer dans la zone d'extraction / préparation de la réaction d'amplification)

Chaque échantillon requiert l'utilisation d'un tube. Le kit permet d'effectuer 25 réactions MBR, 25 réactions mcr, 25 réactions ABL, contrôles positifs et négatifs inclus. Le nombre minimum de réactions par étape est de neuf : trois réactions MBR (contrôle positif, contrôle négatif et échantillon analysé), trois réactions mcr (idem aux précédentes), trois réactions ABL (idem aux précédentes).

Avant de lancer l'étape, il est nécessaire de :

- Décongeler les échantillons à analyser, le «**BCL2 - Positive Control**», les centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond et les conserver dans la glace.
- Décongeler un tube «*monotest*» BLEU (MBR) pour chacun des échantillons à analyser, un pour le contrôle négatif et un pour le contrôle positif, les centrifuger* pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond ; les marquer de façon reconnaissable avec un feutre indélébile et les conserver dans la glace.
- Décongeler un tube «*monotest*» NEUTRE (mcr) pour chacun des échantillons à analyser, un pour le contrôle négatif et un pour le contrôle positif, les centrifuger* pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond ; les marquer de façon reconnaissable avec un feutre indélébile et les conserver dans la glace.
- Décongeler un tube «*monotest*» JAUNE (ABL) pour chacun des échantillons à analyser et un pour le contrôle négatif, les centrifuger* pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond ; les marquer de façon reconnaissable avec un feutre indélébile et les conserver dans la glace.

*Remarque : Les tubes «*monotest*» sont de type "à paroi fine". Ils doivent donc être manipulés délicatement afin d'éviter de les casser. Lorsque cela est nécessaire, les centrifugations doivent être exécutées avec les réducteurs spéciaux et suivant les modalités indiquées dans cette notice d'instructions et d'utilisation.

- Prélever le «**DNA pol. 2U / µL**», le centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond et le conserver dans la glace.
- En suivant les indications du tableau ci-dessous, diluer l'enzyme «**DNA pol. 2U / µL**» avec de l'eau bi-distillée stérile. Préparer un volume d'enzymes diluées suffisant pour toutes les réactions MBR, mcr, ABL (contrôles compris) plus un, afin de disposer d'une marge de sécurité. L'enzyme diluée ne peut être conservée.

Nombre de réactions	DNA pol. 2U / µL	Eau	Volume total
4	2,0 µL	18,0 µL	20 µL
5	2,5 µL	22,5 µL	25 µL
6	3,0 µL	27,0 µL	30 µL
7	3,5 µL	31,5 µL	35 µL
8	4,0 µL	36,0 µL	40 µL
9	4,5 µL	40,5 µL	45 µL
10	5,0 µL	45,0 µL	50 µL
11	5,5 µL	49,5 µL	55 µL
12	6,0 µL	54,0 µL	60 µL
13	6,5 µL	58,5 µL	65 µL
14	7,0 µL	63,0 µL	70 µL
15	7,5 µL	67,5 µL	75 µL
16	8,0 µL	72,0 µL	80 µL
17	8,5 µL	76,5 µL	85 µL
18	9,0 µL	81,0 µL	90 µL
19	9,5 µL	85,5 µL	95 µL
20	10,0 µL	90,0 µL	100 µL
21	10,5 µL	94,5 µL	105 µL

1. Ajouter à chaque tube «*monotest*» BLEU (MBR), NEUTRE (mcr) et JAUNE (ABL) 5 µL d'ADN polymérase thermostable diluée (1 U).
2. Ajouter à chaque tube «*monotest*» BLEU, NEUTRE et JAUNE 5 µL de l'ADN obtenu. Procéder de la même façon avec le contrôle négatif et le contrôle positif.
3. Transférer les tubes «*monotest*» BLEU, NEUTRE et JAUNE dans le thermocycleur dans la zone d'amplification / révélation des produits d'amplification et lancer le cycle de température de la première amplification.

Préparation de la seconde amplification

(À effectuer dans la zone d'extraction / préparation de la réaction d'amplification)

Avant de lancer l'étape, il est nécessaire de :

- Prélever le «**DNA pol. 2U / µL**», le centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond et le conserver dans la glace.
- Décongeler autant de tubes «*monotest*» ROUGES (MBR) que de tubes bleus, les centrifuger* pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond ; les marquer de façon reconnaissable à l'aide d'un feutre indélébile et les conserver dans la glace.
- Décongeler autant de tubes «*monotest*» VERTS (mcr) que de tubes neutres, les centrifuger* pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond ; les marquer de façon reconnaissable à l'aide d'un feutre indélébile et les conserver dans la glace.

*Remarque : Les tubes «*monotest*» sont de type "à paroi fine". Ils doivent donc être manipulés délicatement afin d'éviter de les casser. Lorsque cela est nécessaire, les centrifugations doivent être exécutées avec les réducteurs spéciaux et suivant les modalités indiquées dans cette notice d'instructions et d'utilisation.

- En suivant les indications du tableau ci-dessus, diluer l'enzyme «DNA pol. 2U / µL» avec de l'eau bi-distillée stérile. Préparer un volume d'enzyme dilué, suffisant pour toutes les réactions MBR et mcr prévues (contrôles compris) plus un, afin de disposer d'une marge de sécurité. L'enzyme diluée ne peut être conservée.

- Ajouter à chaque tube «*monotest*» ROUGE (MBR) et VERT (mcr) 5 µL d'ADN polymérase thermostable diluée (1 U).
- Ajouter à chaque tube «*monotest*» ROUGE (MBR), 1 µL de produit de la première amplification du tube «*monotest*» BLEU (MBR) correspondant.
- Ajouter à chaque tube «*monotest*» VERT (mcr), 1 µL de produit de la première amplification du tube «*monotest*» NEUTRE (mcr) correspondant.

Remarque : Le produit de la première amplification peut contaminer les tests suivants. Confiner le produit résiduel de la première amplification et changer de gants au terme de cette phase de la procédure.

- Transférer les tubes «*monotest*» ROUGES et VERTS dans le thermocycleur dans la zone d'amplification / révélation des produits d'amplification et lancer le cycle de température de la seconde amplification.

Remarque : Le produit de réaction peut être conservé à -20°C pendant un mois au maximum.

Révélation du produit d'amplification spécifique

(À effectuer dans la zone d'amplification / révélation des produits d'amplification)

Le produit spécifique de la seconde amplification peut être révélé et identifié par séparation électrophorétique en utilisant un gel d'agarose 4% avec bromure d'éthidium 1 µg / mL dans un tampon TAE 1x (20 mM TRIS base, 20 mM TRIS acétate, 1 mM EDTA disodique), comme dans le produit «ELECTROPHORESIS 3».

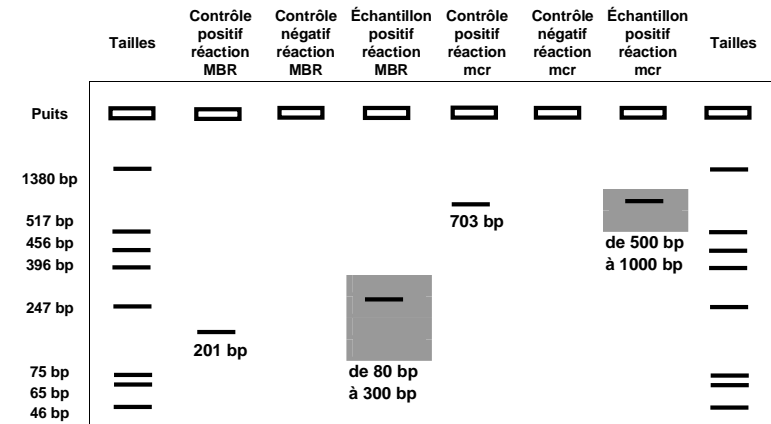
Les produits spécifiques de la seconde amplification MBR ont une taille comprise entre : 80 et 300 bp

Les produits spécifiques de la seconde amplification mcr ont une taille comprise entre : 500 et 1000 bp

Le produit spécifique de l'amplification ABL a une taille de : 715 bp

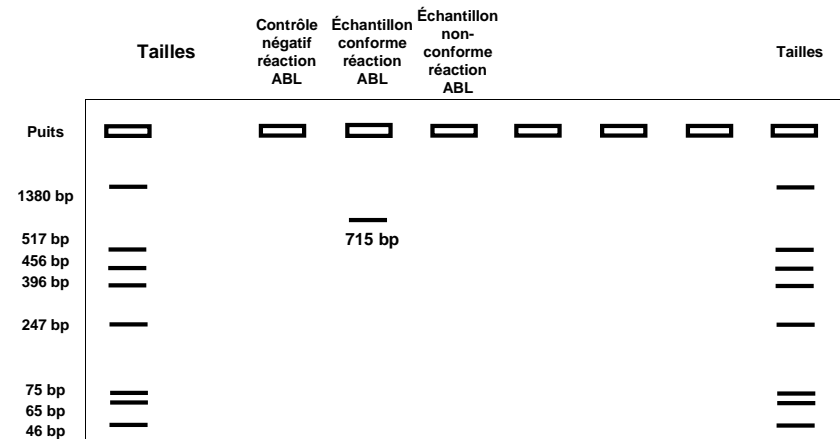
Remarque : Le produit de la seconde amplification peut contaminer les tests suivants. Confiner le produit résiduel de la seconde amplification et les déchets produits au cours de la phase de révélation.

À titre d'exemple, est reportée ci-dessous une figure schématisée représentant le résultat de la séparation électrophorétique des produits de la seconde amplification MBR et mcr.



Remarque : À cause d'une homologie parfois présente dans la région J du gène IgH, il est possible d'observer, en association au produit spécifique de la seconde amplification MBR ou mcr, un autre produit d'amplification de dimensions supérieures d'environ 500 pb.

À titre d'exemple, est reportée ci-dessous une figure schématisée représentant le résultat de la séparation électrophorétique des produits de l'amplification ABL.



Il est impératif de valider l'identité du produit de la seconde amplification d'un échantillon en comparant sa migration sur gel à celle d'un marqueur de poids moléculaire et à celle du produit de la seconde amplification du contrôle positif.

La présence éventuelle de produits non spécifiques de tailles différentes de celles des produits spécifiques de la seconde amplification d'un échantillon n'a aucune signification aux fins de la recherche de l'ADN des transcrits MBR et mcr et de l'ADN du gène ABL.

Interprétation des résultats

Les résultats des réactions de contrôle négatif et de contrôle positif sont utilisés pour valider l'étape d'amplification comme décrit dans les tableaux suivants:

Amplification des contrôles négatifs	Amplification
Produit spécifique MBR, mcr et ABL	
ABSENT	CORRECTE

Amplifications des contrôles positifs	Amplification
Produit spécifique MBR et mcr	
PRÉSENT	CORRECTE

Si le produit d'amplification spécifique est présent dans l'une des réactions de contrôle négatif, cela indique la survenue de problèmes lors de la phase d'amplification (contamination) pouvant générer de faux résultats positifs. L'étape n'est pas valable et doit être répétée à partir de la phase d'amplification.

Si le produit spécifique d'amplification est absent dans l'une des réactions de contrôle positif, cela indique la survenue de problèmes lors de la phase d'amplification (amplification inefficace ou absente) pouvant générer des résultats faux négatifs. L'étape n'est pas valable et doit être répétée à partir de la phase d'amplification.

Ce kit est en mesure de révéler une quantité minimum de 10 copies d'ADN des transcrits MBR ou mcr par réaction d'amplification (limite de révélation du produit, voir paragraphe sur les Caractéristiques des performances page 14).

Les résultats des réactions relatives aux échantillons analysés sont utilisés pour évaluer la présence d'ADN de MBR et mcr comme décrit dans le tableau suivant :

Amplification de l'échantillon		Échantillon adapté	Résultat du test	ADN de MBR ou mcr
Produit spécifique MBR et mcr	Produit spécifique ABL			
ABSENT	ABSENT	non adapté	non valable	-
	PRÉSENT	adapté	valable, négatif	NON RÉVÉLÉ
PRÉSENT	ABSENT	adapté	valable, positif	PRÉSENT
	PRÉSENT	adapté	valable, positif	PRÉSENT

Si, aussi bien le produit spécifique d'amplification de MBR et mcr que celui du gène de l'ABL de l'amplification de contrôle sont absents de la réaction d'un échantillon, cela indique la survenue de problèmes lors de la phase d'amplification (amplification inefficace ou absente) ou de la phase d'extraction (absence d'ADN, présence d'inhibiteurs ou échantillon initial avec un nombre de cellules insuffisant) qui peuvent engendrer des résultats faux négatifs. L'échantillon n'est pas conforme, le test n'est pas valable et doit être répété à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.

Si le produit spécifique d'amplification de MBR et mcr est absent de la réaction d'un échantillon et que celui du gène ABL de l'amplification de contrôle est présent, l'ADN des transcrits MBR et mcr n'ont pas été révélés dans l'ADN extrait de l'échantillon, mais il n'est pas à exclure que l'ADN des transcrits soit présent, à un titre inférieur au seuil de révélation du produit (seuil de révélation du produit, voir paragraphe sur les Caractéristiques des performances, page 14). Dans ce cas, le résultat serait un faux négatif.

Les résultats de ce produit doivent être interprétés compte tenu de toutes les données cliniques et des autres examens de laboratoire concernant le patient.

***Remarque:** Lorsque, dans une réaction d'amplification, le produit spécifique d'amplification des transcrits MBR ou mcr et que celui du gène ABL de l'amplification de contrôle est absent, l'échantillon est quoi qu'il en soit conforme et le résultat positif du test est valable. En effet, la réaction d'amplification du gène ABL a une efficacité mineure (single round) à celle de la réaction d'amplification de MBR et mcr (nested).

Calcul des limites de révélation

Lorsque l'on utilise une méthode d'extraction et une unité de mesure particulières, le seuil de révélation peut être calculé à partir du seuil de révélation de la réaction d'amplification selon cette formule :

$$\text{Seuil de révélation} = Fe \times Ee \times Fa \times 10 \text{ copies ADN / réaction}$$

Fe est le rapport entre l'unité de mesure de référence et l'échantillon utilisé dans l'extraction, par exemple :

Extraction	unité de mesure	échantillon extrait	Fe
«EXTRAcell»	copie ADN / 1.000.000 cellules	500.000 cellules	$Fe = 10^6 \text{ c.} / 5 \times 10^5 \text{ c.} = 2$

Ee est l'inverse de l'efficacité de l'extraction, par exemple :

Extraction	efficacité de l'extraction	Ee
«EXTRAcell»	efficacité environ 100%, c'est-à-dire 1,0	$Ee = 1 / 1,0 = 1$

Fa est le rapport entre le volume d'ADN extrait et le volume utilisé dans la réaction d'amplification, par exemple :

Extraction	volume d'ADN extrait	volume en réaction	Fa
«EXTRAcell»	100 µL	5 µL	$Fa = 100 \mu\text{L} / 5 \mu\text{L} = 20$

Lorsque l'on utilise le kit d'extraction d'ELITechGroup S.p.A., la formule devient :

Extraction	Seuils de révélation
«EXTRAcell»	Seuil de révélation = 400 copies ADN / 1.000.000 cellules

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser avec ce produit uniquement l'ADN extrait des échantillons biologiques suivants : sang périphérique prélevé sur EDTA, sang médullaire prélevé sur EDTA ou sodium citrate, échantillons biopsiques frais et congelés.

Ne pas utiliser l'ADN extrait d'échantillons contenant de l'héparine : l'héparine inhibe la réaction d'amplification des acides nucléiques et génère des résultats erronés.

Ne pas utiliser d'ADN extrait contaminé par hémoglobine : ces substances peuvent inhiber les réactions d'amplification des acides nucléiques et générer des résultats erronés.

Aucune donnée n'est disponible concernant les éventuels phénomènes d'inhibition par des médicaments antibiotiques, antiviraux, chimiothérapeutiques ou immunosuppresseurs.

Les résultats obtenus avec ce produit sont subordonnés à la bonne exécution de la collecte, du transport, de la conservation et de la préparation des échantillons ; pour éviter tout résultat erroné, il est donc essentiel d'y apporter le plus grand soin et de suivre attentivement les instructions fournies avec les produits pour l'extraction des acides nucléiques.

Compte tenu de sa forte sensibilité analytique, la méthode d'amplification nested des acides nucléiques utilisée dans ce produit, est sujette à contamination par des échantillons cliniques positifs à MBR et mcr, par des contrôles positifs et par les produits mêmes de la réaction d'amplification. Les contaminations conduisent à des résultats faux positifs. Les modes de réalisation du produit peuvent limiter les contaminations ; cependant, ces phénomènes ne peuvent être évités qu'avec une bonne pratique des techniques de laboratoire et le respect scrupuleux des consignes fournies dans cette notice.

Pour éviter tout accident pouvant avoir des conséquences graves pour l'utilisateur ou des tierces personnes, ce test doit être réalisé par un personnel formé à la manipulation aussi bien des échantillons biologiques pouvant transmettre des agents infectieux que des produits chimiques classés comme dangereux.

Pour éviter tout accident pouvant avoir des conséquences graves pour l'utilisateur ou des tierces personnes, l'utilisation de produit requiert le port de vêtements de travail et des locaux adaptés à la manipulation aussi bien des échantillons biologiques pouvant transmettre des agents infectieux que des produits chimiques classés comme dangereux.

Ce produit doit être manipulé par un personnel formé aux procédures de biologie moléculaire, notamment l'extraction, l'amplification et la révélation d'acides nucléiques afin d'éviter d'aboutir à des résultats erronés.

L'utilisation de ce produit implique de disposer de zones distinctes pour l'extraction / révélation des réactions d'amplification et pour l'amplification / révélation des produits d'amplification afin d'éviter tout résultat faux positif.

L'utilisation de ce produit implique le port de vêtements de travail et l'utilisation d'instruments dédiés pour l'extraction / préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification / révélation des produits d'amplification afin d'éviter tout résultat faux positif.

Un résultat négatif obtenu avec ce produit indique que l'ADN des transcrits MBR et mcr n'a pas été révélé dans l'ADN extrait de l'échantillon mais il n'est pas à exclure que l'ADN des transcrits MBR et mcr soit présent à un titre inférieur au seuil de révélation du produit (voir paragraphe sur les Caractéristiques des performances page 14) ; dans ce cas, le résultat serait un faux négatif.

À l'instar de tous les autres dispositifs diagnostiques, les résultats obtenus avec ce produit doivent être interprétés compte tenu de toutes les données cliniques et des autres examens de laboratoire concernant le patient.

À l'instar de tout autre dispositif de diagnostic, ce produit présente un risque résiduel de résultats non valables, faux positifs et faux négatifs. Ce risque résiduel ne peut être supprimé ni même diminué. Dans certaines situations, ce risque résiduel peut contribuer à la prise de décisions erronées pouvant avoir des conséquences graves pour le patient.

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Sensibilité analytique : limite de révélation des MBR OligoMIX et mcr OligoMIX

La sensibilité analytique de ces OligoMIX permet d'identifier la présence d'environ 10 molécules d'ADN cible dans les 5 µL d'ADN extrait ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique du test, comme limite de révélation, a été déterminée en utilisant comme matériel de référence deux ADN plasmidiques contenant le produit d'amplification dont la concentration initiale a été mesurée par spectrophotométrie (pMBR et pmcr).

L'ADN plasmidique pMBR a été dilué à un titre de 10 copies / 5 µL et la dilution a été utilisée dans deux réplifications au cours de six étapes différentes pour effectuer la procédure d'amplification nested avec MBR OligoMIX, produit ELITechGroup S.p.A.

Les résultats finaux sont récapitulés dans le tableau suivant :

Échantillons	Nbre d'étapes	Nbre de réplifications	Positifs MBR	Négatifs MBR
10 copies pMBR	6	2	12	0

L'ADN plasmidique pmcr a été dilué à un titre de 10 copies / 5 µL et utilisé dans deux réplifications au cours de six étapes différentes pour effectuer la procédure d'amplification nested avec mcr OligoMIX, produit ELITechGroup S.p.A.

Les résultats finaux sont récapitulés dans le tableau suivant :

Échantillons	Nbre d'étapes	Nbre de réplifications	Positifs mcr	Négatifs mcr
10 copies pmcr	6	2	12	0

Sensibilité analytique : limites de révélation de l'ABL OligoMIX

La sensibilité analytique de cet OligoMIX permet d'identifier la présence d'environ 100 molécules d'ADN cible dans les 5 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique du contrôle de conformité de l'échantillon, comme seuil de révélation, a été déterminée en utilisant comme matériel de référence l'ADN génomique humain, dont la concentration initiale a été mesurée par spectrophotométrie.

L'ADN génomique humain a été dilué à un titre de 5 ng / 5 µL et la dilution a été utilisée dans deux réplifications au cours de six étapes différentes pour effectuer la procédure d'amplification single round avec l'ABL OligoMIX, produit ELITechGroup S.p.A.

Les résultats finaux sont récapitulés dans le tableau suivant :

Échantillons	Nbre d'étapes	Nbre de réplifications	Positifs ABL	Négatifs ABL
5 ng ADN génomique humain	6	2	12	0

Sensibilité diagnostique : efficacité de la révélation sur les polymorphismes éventuels

La sensibilité diagnostique du test, entendue comme l'efficacité de révélation sur d'éventuels polymorphismes, a été évaluée en comparant des séquences avec des banques de données nucléidiques.

L'examen de l'alignement des régions choisies pour l'hybridation des oligonucléotides d'amorçage pour le transcrit MBR des **MBR OligoMIX** avec les séquences disponibles dans la banque de données des régions génomiques du transcrit BCL2-IgH, a démontré leur conservation et l'absence de mutations significative.

L'examen de l'alignement des régions choisies pour l'hybridation des oligonucléotides d'amorçage pour le transcrit mcr des **mcr OligoMIX** avec les séquences disponibles dans la banque de données des régions génomiques du transcrit BCL2-IgH, a démontré leur conservation et l'absence de mutations significative.

L'examen de l'alignement des régions choisies pour l'hybridation des oligonucléotides d'amorçage pour le gène ABL des **ABL OligoMIX** avec les séquences disponibles dans la banque de données du gène ABL a démontré leur conservation et l'absence de mutations significative.

Spécificité diagnostique: échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, entendue comme confirmation d'échantillons négatifs, a été vérifiée à travers l'analyse de plusieurs échantillons d'ADN génomique humain normal.

La spécificité diagnostique a été vérifiée en utilisant comme matériel de référence de l'ADN génomique humain négatif au transcrit MBR et mcr, dont la concentration initiale a été mesurée par spectrophotométrie.

L'ADN génomique humain a été dilué à la concentration de 500 ng / 5 µL et la dilution a été utilisée dans deux réplifications au cours de six étapes différentes pour effectuer la procédure d'amplification nested avec MBR OligoMIX, produit ELITechGroup S.p.A.

Les résultats finaux sont récapitulés dans le tableau suivant :

Échantillons	Nbre d'étapes	Nbre de réplifications	Positifs MBR	Négatifs MBR
500 ng ADN génomique	6	2	0	12

L'ADN génomique humain a été dilué à la concentration de 500 ng / 5 µL et la dilution a été utilisée dans deux réplifications au cours de six étapes différentes pour effectuer la procédure d'amplification nested avec mcr OligoMIX, produit ELITechGroup S.p.A.

Les résultats finaux sont récapitulés dans le tableau suivant :

Échantillons	Nbre d'étapes	Nbre de réplifications	Positifs mcr	Négatifs mcr
500 ng ADN génomique	6	2	0	12

Spécificité analytique : marqueurs potentiellement interférents

La spécificité analytique du test, entendue comme réactivité croisée avec d'autres marqueurs potentiellement interférents, a été évaluée en comparant des séquences avec des banques de données nucléidiques.

L'examen de l'alignement des régions choisies pour l'hybridation des oligonucléotides d'amorçage pour le transcrit MBR des **MBR OligoMIX** avec les séquences disponibles dans la banque de données de régions génomiques humaines différentes des régions génomiques MBR et IgH, notamment celles du génome humain complet, a démontré la spécificité du système d'amplification.

L'examen de l'alignement des régions choisies pour l'hybridation des oligonucléotides d'amorçage pour le transcrit mcr des **mcr OligoMIX** avec les séquences disponibles dans la banque de données de régions génomiques humaines différentes des régions génomiques mcr et IgH, notamment celles du génome humain complet, a démontré la spécificité du système d'amplification.

L'examen de l'alignement des régions choisies pour l'hybridation des oligonucléotides d'amorçage pour le gène ABL des **ABL OligoMIX** avec les séquences disponibles dans la banque de données de régions génomiques humaines différentes des gènes humains ABL, notamment celles du génome humain complet, a démontré la spécificité du système d'amplification.

Remarque : Les données et les résultats complets des tests effectués pour l'évaluation des caractéristiques des performances du produit ont été enregistrés dans la Section 7 du Fascicule Technique de Produit "BCL2 oligomix Alert kit", FTP BANG08.

BIBLIOGRAPHIE

J. G. Gribben et al. (1994) *Blood* 12: 3800 - 3807

PROBLÈMES ET SOLUTIONS

Produit spécifique d'amplification présent dans la réaction de contrôle négatif

Causes éventuelles	Solutions
Erreur pendant la distribution de l'ADN extrait.	Ouvrir un tube à la fois, éviter d'en répandre le contenu, changer chaque fois d'embout.
Erreur pendant la distribution du produit de première amplification	Ouvrir un tube à la fois, éviter d'en répandre le contenu, changer chaque fois d'embout.
Contamination des réactifs préparés pour l'étape.	Suivre attentivement la dilution et la distribution de l'enzyme, changer chaque fois d'embout.
Contamination de l'eau stérile pour la dilution de l'enzyme.	Utiliser un nouvel aliquot d'eau stérile.
Contamination du stock d'enzymes.	Utiliser un nouvel aliquot d'enzymes.
Contamination de la zone d'extraction / préparation des réactions d'amplification.	Nettoyer les surfaces et les instruments à l'aide d'un détergent aqueux, laver les blouses et remplacer les tubes et les embouts utilisés.

Produit spécifique d'amplification absent dans la réaction du Positive Control

Causes éventuelles	Solutions
Enzyme trop diluée ou erreur pendant la distribution de l'enzyme.	Vérifier les calculs de dilution, suivre attentivement la distribution de l'enzyme et mélanger correctement.
Erreur pendant la distribution du contrôle positif.	Suivre attentivement la distribution du contrôle positif.
Dénaturalisation du contrôle positif.	Utiliser un nouvel aliquot de contrôle positif.
Erreur de paramétrage du cycle de température.	Contrôler le cycle de température paramétré sur le thermocycleur.
Erreur pendant la distribution du produit de première amplification	Prélever et distribuer soigneusement le produit de première amplification dans la seconde amplification.
Erreur pendant la distribution du produit de seconde amplification dans le gel.	Charger soigneusement le produit de la seconde amplification dans le gel










Produits non spécifiques d'amplification présents dans les réactions des échantillons

Causes éventuelles	Solutions
Enzyme trop concentrée.	Vérifier les calculs de dilution de l'enzyme.
Temps de préparation de la première réaction d'amplification trop longs.	Conserver dans la glace les tubes auxquels a déjà été ajouté le ADN extrait, jusqu'à leur transfert dans le
Erreur de paramétrage du cycle de température.	Contrôler le cycle de température paramétré sur le thermocycleur.
Excès d'ADN extrait dans la réaction.	Évaluer la concentration d'ADN extrait, ne pas ajouter plus d'1 µg d'ADN par réaction.

Produit spécifique d'amplification absent dans la réaction ABL de contrôle des échantillons

Causes éventuelles	Solutions
Présence d'héparine dans l'échantillon de sang total.	L'échantillon de sang doit utiliser comme anticoagulant EDTA ou sodium citrate.
Erreur de conservation de l'échantillon de sang.	Pour l'extraction de l'ADN, le sang doit être traité dans les heures suivant immédiatement le prélèvement et il ne doit jamais être congelé.
Erreur en phase d'extraction.	Contrôler les opérations d'extraction. Préparer et effectuer l'extraction en suivant scrupuleusement les consignes fournies.
Dégradation de l'échantillon extrait.	L'extraction de l'ADN doit être effectuée à partir de matériel et de réactifs dépourvus de DNase. L'ADN extrait doit être conservé à -20°C ou à -70°C.
Erreur en phase d'amplification.	Consulter les suggestions fournies au paragraphe «Produit spécifique d'amplification absent dans la réaction de contrôle positif».

LÉGENDE DES SYMBOLES

-  Référence du catalogue.
-  Seuil supérieur de température.
-  Numéro du lot.
-  Date de péremption (dernier jour du mois).
-  *In vitro* diagnostic.
-  Conforme aux exigences essentielles de la Directive européenne 98/79/CE concernant le diagnostic *in vitro*
-  Contenu suffisant pour "N" tests.
-  Attention, consulter le mode d'emploi.
-  Fabriqué par

L'achat de ce produit autorise l'acheteur à l'utiliser pour l'amplification et le marquage de séquences d'acides nucléiques afin d'établir des diagnostics humains *in vitro*. Ce droit n'est accordé que si le produit fourni est utilisé conjointement à un produit couvert par une licence pour le "Positive Control" et pour la détection fabriqués par ELITechGroup S.p.A.
L'achat de ce produit ne confère aucun droit général ni aucune autre licence, d'aucun type, différents de cette autorisation spécifique d'utilisation.