

Instructions d'utilisation

**IdentiClone® *IGK* Gene Clonality Assay**

Pour l'identification des réarrangements clonaux de gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline.

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
REF 91020021	IdentiClone <i>IGK</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Réactions
REF 91020031	IdentiClone <i>IGK</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Réactions

Table des matières

1. UTILISATION PREVUE.....	3
2. RESUME ET EXPLICATION DU TEST	3
2.1. Contexte	3
2.2. Résumé.....	3
3. PRINCIPES DE LA PROCEDURE.....	4
3.1. Amplification en chaîne par polymérase (PCR)	4
3.2. Détection par fluorescence différentielle	5
4. REACTIFS	5
4.1. Composants du réactif	5
4.2. Mises en garde et précautions	6
4.3. Conservation et manipulation	6
5. INSTRUMENTS.....	7
5.1. Thermocycleur	7
5.2. Instruments d'électrophorèse capillaire ABI	7
6. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	8
6.1. Précautions	8
6.2. Substances interférentes	8
6.3. Conditions de prélèvement et manipulation	8
6.4. Préparation de l'échantillon.....	8
6.5. Conservation des échantillons.....	8
7. PROCEDURE DE TEST.....	9
7.1. Matériel fourni.....	9
7.2. Matériel nécessaire (non fourni)	9
7.3. Préparation des réactifs.....	10
7.4. Amplification.....	11
7.5. Détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI	11
7.6. Contrôle qualité.....	12
7.7. Contrôles positifs recommandés.....	13
8. INTERPRETATION DES RESULTATS.....	13
8.1. Analyse.....	13
8.2. Interprétation de l'échantillon	14
9. LIMITES DE LA PROCEDURE.....	14
10. VALEURS ATTENDUES	14
10.1. Taille attendue des produits amplifiés	14
10.2. Données de l'échantillon.....	15
11. CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE.....	16
12. BIBLIOGRAPHIE.....	16
13. SUPPORT TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT.....	16
14. SYMBOLES.....	17
15. INFORMATIONS LEGALES.....	17
15.1. Garantie et responsabilité	17
15.2. Brevets et marques	17

1. Utilisation prévue

Le test IdentiClone *IGK* Gene Clonality Assay est un produit de diagnostic *in vitro* destiné à la détection des réarrangements clonaux de gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline par amplification en chaîne par polymérase (PCR, polymerase chain reaction) chez les patients suspectés d'être atteints de syndromes lymphoprolifératifs. Le test *IGK* Gene Clonality Assay peut notamment être utilisé pour :

- Identifier la clonalité dans le cas de syndromes lymphoprolifératifs atypiques
- Étayer un diagnostic différentiel entre lésions réactives et hémopathies malignes
- Déterminer la lignée présumée dans le cas de syndromes lymphoprolifératifs monoclonaux matures
- Identifier des marqueurs tumoraux spécifiques (réarrangements d'*IGK* et *IGK-K_{de}*) pour la surveillance après traitement
- Surveiller et évaluer la récurrence de la maladie

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. Ces réarrangements de gènes génèrent des produits de longueur et de séquence uniques pour chaque cellule. Par conséquent les analyses par amplification en chaîne par polymérase (PCR) peuvent être utilisées pour identifier les populations de lymphocytes issues d'une seule cellule en détectant les réarrangements de gène V-J uniques présents dans ces loci du gène du récepteur antigénique.¹ Cette analyse par PCR utilise différentes amorces ADN consensus ciblant les régions génétiques conservées au sein du gène de chaîne lourde d'immunoglobuline. Ce test permet de détecter la majeure partie des tumeurs malignes à lymphocytes B clonaux à partir de l'ADN. Les produits des tests peuvent être analysés avec de nombreux formats de détection, notamment par électrophorèse sur gel ou capillaire.

Les tests IdentiClone d'Invivoscribe représentent une nouvelle approche de l'analyse de clonalité par PCR. Ces tests standardisés ont été soigneusement optimisés en analysant des échantillons de contrôles positifs et négatifs avec des mélanges mères (master mixes) de multiplexes. Le développement des tests a été suivi d'une validation importante comprenant l'analyse de plus de 400 échantillons cliniques à l'aide de la classification REAL (Revised European/American Lymphoma). L'analyse a été réalisée dans plus de 30 centres d'analyse importants et indépendants dans toute l'Europe dans le cadre d'une étude collaborative connue sous le nom de BIOMED-2 Concerted Action (Action Concertée BIOMED-2).²

Les tests basés sur une détection à l'aide d'analyseurs ABI ne peuvent détecter de manière fiable les populations clonales représentant moins de 1 % de la population totale de lymphocytes. Toujours interpréter les résultats des tests de clonalité moléculaire dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.

2.2. Résumé

Ce kit d'analyse contient trois (3) mélanges mères (master mixes). Le mélange mère (master mix) *IGK* Tube A cible les régions variable (V) et de jonction (J) du locus de la chaîne légère kappa d'immunoglobuline. En revanche, le mélange mère (master mix) *IGK* Tube B cible les réarrangements de séquence dite *K_{de}* « kappa deleting element » avec la région variable (V) et la région intragénique *Jκ-Cκ*. Les réarrangements *Vκ-K_{de}* et *Jκ-Cκ* intron-*K_{de}* obtenus sont le résultat de réarrangements infructueux conservés par le lymphocyte B. Le troisième mélange mère (master mix), Specimen Control Size Ladder, cible plusieurs gènes et génère une série d'amplicons 96, 197, 297, 397 et 602 paires de bases (pb) afin de garantir que la qualité et la quantité d'ADN introduit soient suffisantes pour l'obtention d'un résultat fiable. Un seul programme de thermocycleur et des méthodologies de détection similaires sont utilisés pour tous nos tests de clonalité génique. Cela améliore la cohérence et facilite l'apprentissage croisé d'une large gamme de tests différents.

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



3. Principes de la procédure

3.1. Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Les analyses PCR sont utilisées en routine pour l'identification de populations clonales de lymphocytes B. Ces tests amplifient l'ADN entre les amorces qui ciblent les régions variable (V) et de jonction (J) *IGK* Tube A ou les régions variable, J_{κ} - C_{κ} intron et K_{de} *IGK* Tube B. Les régions V et J conservées s'étendent de part et d'autre de la région hypervariable déterminant la complémentarité 3 (CDR3, complementarity-determining region 3) marquée par des réarrangements génétiques programmés pendant la maturation de tous les lymphocytes B et T. Les gènes du récepteur antigénique qui subissent un réarrangement sont ceux des chaînes lourdes et des chaînes légères de l'immunoglobuline des lymphocytes B, ainsi que les gènes des récepteurs des lymphocytes T. Chaque lymphocyte B et T possède un seul réarrangement V-J fonctionnel dont la longueur et la séquence sont uniques. Ainsi, quand l'ADN d'une population normale ou polyclonale est amplifié avec des amorces ADN qui flanquent la région V-J, une courbe en cloche (distribution gaussienne) des produits d'amplification est générée dans la plage de taille attendue. Sur gel, cette distribution des produits apparaît sous la forme d'une traînée. Cette distribution gaussienne reflète la population hétérogène des réarrangements V-J. (Dans certains cas, en l'absence d'ADN de lymphocyte, aucun produit n'est visible.) 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.

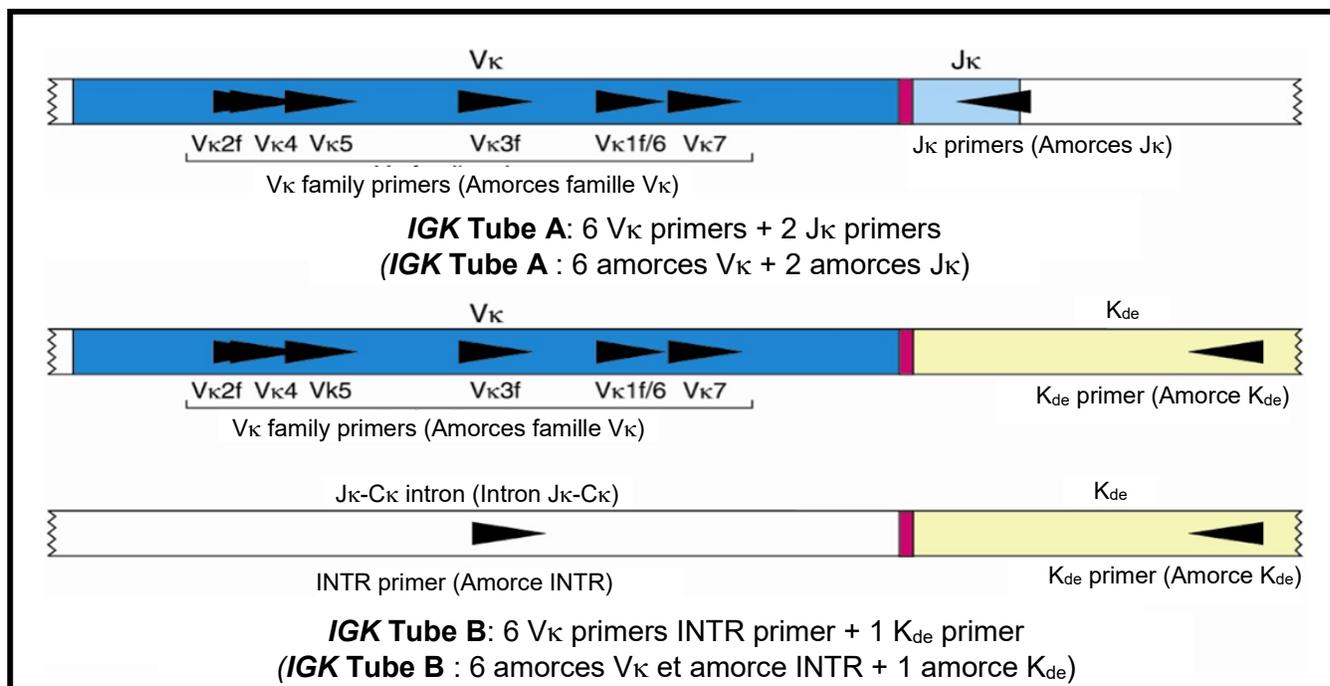


Figure 1. On voit ici une représentation simple de l'organisation du gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline réarrangé sur le chromosome 2p11.2. La figure montre les positions et orientations relatives pour les amorces de V_{κ} , J_{κ} et K_{de} , qui sont présentes dans les tubes de mélanges mères (master mix) *IGK*.

Les gènes des récepteurs antigéniques étant polymorphiques (composés d'une population hétérogène de séquences ADN apparentées), il est difficile d'utiliser un seul jeu de séquences ADN amorces pour cibler toutes les régions flanquantes conservées autour du réarrangement V-J. La diversité de la région N et les mutations somatiques modifient encore plus les séquences d'ADN de ces régions. Ainsi, les mélanges mères (master mixes) de multiplexes ciblant plusieurs régions FR sont nécessaires à l'identification de la majorité des réarrangements clonaux. Comme indiqué, les réarrangements clonaux sont identifiés comme des produits de taille unique proéminents sur le fond des produits d'amplification de tailles variables qui forment une distribution gaussienne autour d'une taille moyenne d'un réarrangement statistiquement majoritaire. Pour les réarrangements V_{κ} - J_{κ} , la longueur de CDR3 est limitée et les réarrangements dans cette région montrent une déviation significative (distribution platykurtique).⁴

3.2. Détection par fluorescence différentielle

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

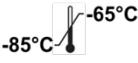
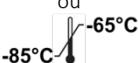
4. Réactifs

4.1. Composants du réactif

Tableau 1. Kits disponibles

N° de référence	Description	Quantité
REF 91020021	IdentiClone <i>IGK</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 réactions
REF 91020031	IdentiClone <i>IGK</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 réactions

Tableau 2. Composants du réactif

Réactif	N° de référence (REF)	Composants du réactif (substances actives)	Quantité unitaire	91020021 Nb d'unités	91020031 Nb d'unités	Temp. de conservation
Mélanges mères (master mixes)	21020011CE	IGKTube A – 6FAM Oligonucléotides multiples ciblant les régions variable et de jonction du gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline en solution saline tamponnée.	1 500 µl	1	10	
	21020021CE	IGKTube B – 6FAM Oligonucléotides multiples ciblant les régions variable, Jκ - Cκ intron et K _{de} du gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline en solution saline tamponnée.	1 500 µl	1	10	
Mélange mère (master mix) témoin d'amplification	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM Oligonucléotides multiples ciblant des gènes domestiques.	1 500 µl	1	10	
ADN contrôle positif	40880370	IVS-0007 Clonal Control DNA 200 µg/ml d'ADN dans une solution TE à 1/10 ^e	100 µl	1	5	
ADN contrôle négatif (normal)	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA 200 µg/ml d'ADN dans une solution TE à 1/10 ^e	100 µl	1	5	

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

4.2. Mises en garde et précautions

- **IVD** Ce produit est destiné au diagnostic *in vitro*.
- 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 de qualité « biologie 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 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 -85°C et -65°C.**
- La température de conservation optimale des ADN contrôles est de 2°C à 8°C, mais les ADN contrôles peuvent également être conservés entre -85°C et -65°C.
- Tous les réactifs et les contrôles doivent être décongelés et vortexés ou mélangés soigneusement avant utilisation pour une remise en suspension complète. Un vortexage excessif pourrait endommager l'ADN et causer la perte des fluorophores des amorces marquées.
- Les matériels sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.
- En raison de la concentration élevée en sel, les mélanges mères (master mixes) de PCR sont sensibles aux cycles de congélation/décongélation. Si nécessaire, aliquoter les mélanges mères (master mixes) en cryotubes à bouchon à vis avec joint.

5. Instruments

5.1. Thermocycleur

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

5.2. Instruments d'électrophorèse capillaire ABI

- Utilisation ou fonction : détection et analyse de fragment
- Caractéristiques de performance et spécifications :
 - Les instruments d'électrophorèse capillaire suivants peuvent être utilisés pour ce test :
 - ABI 310 Genetic Analyzer (1-capillary) (Analyseur génétique (1 capillaire))
 - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4-capillaries) (Analyseur génétique (4 capillaires))
 - ABI 3100 Genetic Analyzer (16-capillaries) (Analyseur génétique ABI 3100 (16 capillaires))
 - ABI 3130 Genetic Analyzer (4-capillaries) (Analyseur génétique (4 capillaires))
 - ABI 3130xL Genetic Analyzer (16-capillaries) (Analyseur génétique (16 capillaires))
 - ABI 3500 Genetic Analyzer (8-capillaries) (Analyseur génétique (8 capillaires))
 - ABI 3500xL Genetic Analyzer (24-capillaries) (Analyseur génétique (24 capillaires))
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.
- L'instrument ABI doit être étalonné avec les standards de matrice adéquats comme indiqué à la section 7.2 *Matériel nécessaire 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 la préparation des échantillons.

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 (non significatif à faible concentration)
- Héparine

6.3. Conditions de prélèvement et manipulation

Ce test analyse l'ADN génomique provenant des sources suivantes :

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

6.4. Préparation de l'échantillon

Extraire l'ADN génomique des échantillons du patient dès que possible. Remettre en suspension l'ADN à une concentration finale de 100 µg à 400 µg par ml dans 1/10^e de TE (1 mM de Tris-HCl, pH 8,0 ; 0,1 mM d'EDTA) ou dans de l'eau de qualité de biologie moléculaire ou stérile USP. Il s'agit d'un système d'analyse sensible. Une large gamme de concentrations d'ADN 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 (Marqueur de Taille Contrôle) 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 entre 2°C et 8°C ou entre -85°C et -65°C jusqu'à utilisation.

7. Procédure de test

7.1. Matériel fourni

Tableau 3 : Composants du kit

N° de référence	Description
REF 21020011CE	IGK Tube A – 6FAM
REF 21020021CE	IGK Tube B – 6FAM
REF 20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM
REF 40880370	IVS-0007 Clonal Control DNA
REF 40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA

7.2. Matériel nécessaire (non fourni)

Tableau 4 : Matériel nécessaire (non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs ou matériels recommandés et fournisseurs	Numéro de référence REF	Remarques
ADN polymérase	Roche:	05206944190	S.O. (sans objet)
	<ul style="list-style-type: none"> EagleTaq DNA Polymerase Invivoscribe, Inc.: <ul style="list-style-type: none"> FalconTaq DNA Polymerase ou équivalent 	60970130	
Eau distillée désionisée de qualité biologie moléculaire ou USP	S.O.	S.O.	Stérile et exempte de toute DNase et RNase.
Pipettes étalonnées	Rainin: <ul style="list-style-type: none"> Pipettes P-2, P-20, P-200 et P-1000 Ou pipettes SL-2, SL-20, SL-200 et SL-1000 	S.O.	Précision requise pour mesurer des volumes allant de 1 µl à 1 000 µl.
Thermocycleur	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Veriti Dx Thermal Cyclers Bio-Rad: <ul style="list-style-type: none"> MJ Research PTC-100 ou PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer <ul style="list-style-type: none"> PE 9600 ou PE 9700 	S.O.	S.O.
Vortex	S.O.	S.O.	S.O.
Plaques ou tubes PCR	S.O.	S.O.	Stériles
Pointes de pipette à filtre	S.O.	S.O.	Stériles, exemptes de RNase/DNase/pyrogène
Microtubes à centrifuger	S.O.	S.O.	Stériles
Instrument d'électrophorèse capillaire ABI	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> ABI 310, 3100 ou 3500 series 	S.O.	S.O.
Formamide Hi-Di	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> Hi-Di™ Formamide 	4311320	S.O.
Marqueurs de taille standard	Invivoscribe, Inc.: <ul style="list-style-type: none"> Hi-Di Formamide avec les marqueurs de taille ROX pour ABI 3100 	60980061	S.O.
	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> Pour les instruments ABI 3100 ou 3130 : <ul style="list-style-type: none"> GeneScan™ - 400HD [ROX]™ 	402985	
	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> Pour les instruments ABI 3500 : <ul style="list-style-type: none"> GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0 	4408399	
Jeux de fluorophores (Dye sets) pour calibration spectrale	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> Pour les instruments ABI 3100 et 3130: <ul style="list-style-type: none"> DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D) 	4345827	S.O.

Tableau 4 : Matériel nécessaire (non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs ou matériels recommandés et fournisseurs	Numéro de référence (REF)	Remarques
Jeux de fluorophores (Dye sets) pour calibration spectrale	<ul style="list-style-type: none"> Pour les instruments ABI 310 : <ul style="list-style-type: none"> NED Matrix Standard Et Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX] Pour les instruments ABI 3500 : <ul style="list-style-type: none"> DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)) 	402996 401546 4345833	S.O.
Polymère	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> POP-4™ Polymer : <ul style="list-style-type: none"> POP-4 pour 310 Genetic Analyzers POP-4 pour 3100/3100-Avant Genetic Analyzers POP-4 pour 3130/3130xL Genetic Analyzers POP-7™ Polymer : <ul style="list-style-type: none"> POP-7 pour 3130/3130xL Genetic Analyzers POP-7 pour 3500/3500xL Genetic Analyzers 	402838 4316355 4352755 4352759 4393714	S.O.
Tampon	Applied Biosystems : <ul style="list-style-type: none"> 10X Genetic Analyzer Buffer with EDTA 	402824	Diluer au 1/10 ^e dans de l'eau stérile avant utilisation

7.3. Préparation des réactifs

- Tous les échantillons inconnus peuvent être analysés avec le mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder afin de garantir que les échantillons d'ADN ne contiennent pas d'inhibiteur d'amplification et qu'ils sont de qualité adéquate et en quantité suffisante pour générer des résultats fiables.
- Un seul résultat par échantillon est acceptable ; cependant, il est recommandé de **dupliquer** chaque échantillon dans la mesure du possible. Si l'analyse dupliquée fournit des résultats incohérents, une nouvelle analyse ou réévaluation de l'échantillon est nécessaire.
- Analyser les contrôles tests positifs, négatifs et sans ADN pour chaque mélange mère (master mix).

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

- Volumes d'aliquote = 45 µl pour chaque réaction.
- Ajouter une réaction supplémentaire toutes les 15 réactions pour corriger les erreurs de pipetage.
- Ainsi, pour chaque mélange mère (master mix) (à l'exception du Specimen Control Size Ladder), le nombre de réactions (**n**) doit être :

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

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

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

- Par conséquent, le volume d'aliquote total pour le Specimen Control Size Ladder mélange mère (master mix) = **m × 45 µl**.

- 7.3.3. Ajouter 1,25 unité (ou 0,25 μl à 5 unités/ μl) d'ADN polymérase Taq par réaction à chaque mélange d'amplification.
- La quantité totale d'ADN polymérase Taq ajoutée à chaque mélange mère (master mix) = $n \times 0,25 \mu\text{l}$, et $m \times 0,25 \mu\text{l}$ pour le Specimen Control Size Ladder mélange mère (master mix).
 - 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 un thermocycleur.
 - Si l'amplification ne peut pas être réalisée immédiatement après la préparation des réactifs, la plaque ou les tubes PCR peuvent être conservés entre 2 °C et 8 °C pendant 24 heures.

Guide pratique :

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

$n \times 45 \mu\text{l}$ de mélange mère (master mix)

$n \times 0,25 \mu\text{l}$ d'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 calculée pour la mesure de la température avec les BioRad MJ Research PTC thermocycleurs.

Tableau 5 : Conditions de thermocyclage

Étape	Température	Durée	Cycles
1	95°C	7 minutes	1
2	95°C	45 secondes	35
3	60°C	45 secondes	
4	72°C	90 secondes	
5	72°C	10 minutes	1
6	15°C	∞	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

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

- Le multiplexage des produits PCR provenant de différents mélanges mères (master mixes) réduira la sensibilité globale de l'analyse.

Plateformes ABI 310, 3100 ou 3130

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

Plateformes ABI 3500 :

Remarque : compte tenu des écarts de performance d'un instrument de la série ABI 3500 à l'autre, les quantités de formamide, d'échantillon et de marqueurs de taille standard (size standards) indiquées dans le protocole correspondent à un point de départ. Il peut être nécessaire d'optimiser le protocole pour chaque instrument ABI 3500.

- 7.5.9. Dans un 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 d'électrophorèse capillaire ABI 3500 conformément au manuel d'utilisation.
 - Les données sont automatiquement affichées sous forme de pics de taille et de couleur spécifiques.
- 7.5.16. Passer en revue le profil et les contrôles, puis effectuer un rapport des résultats. (Voir les sections 8 *Interprétation des résultats* et 10 *Valeurs attendues*.)

7.6. Contrôle qualité

Les contrôles positifs et négatifs (ou normaux) sont fournis avec le kit et peuvent être analysés une seule fois à chaque fois qu'une analyse est réalisée pour assurer une performance correcte de l'analyse. Analyser en outre un contrôle négatif sans ADN (*par ex.* de l'eau) pour tester la contamination du mélange mère (master mix) ou la contamination croisée des réactions due à une technique stérile incorrecte. 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.

7.7. Contrôles positifs recommandés

Les tailles des amplicons indiquées ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI. Les tailles d'amplicons visibles 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 utilisée. 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 6 : Contrôles positifs recommandés

Mélange mère	Cible	Couleur	ADN contrôle	N° de référence	Taille du produit en nt
<i>IGK</i> Tube A	Vκ-Jκ	Bleu	Plage de taille attendue IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	120 - 160, 190 - 210, 260 - 300 143
<i>IGK</i> Tube B	Vκ-K _{de} + intron-K _{de}	Bleu	Plage de taille attendue IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	210 - 250, 270 - 300, 350 - 390 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Différents gènes	Bleu	Plage de taille attendue IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397, 602^a 96, 197, 297, 397, 602 ^a

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

8. Interprétation des résultats

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

8.1. Analyse

- 8.1.1. Les échantillons pour lesquels l'amplification échoue après des essais répétés peuvent être signalés comme suit « Aucun résultat ne peut être fourni concernant cet échantillon, car il contenait de l'ADN en quantité ou qualité insuffisante pour l'analyse ».
- 8.1.2. Répéter l'analyse des échantillons pour lesquels elle a été négative si la réaction du contrôle positif a échoué.
- 8.1.3. Si des échantillons analysés en double fournissent des résultats différents, les analyser et/ou évaluer à nouveau au cas où ils auraient été permutés.
- 8.1.4. Tous les contrôles des tests doivent être examinés avant l'interprétation des résultats des échantillons. Si les contrôles ne fournissent pas les résultats attendus, l'analyse n'est pas fiable et les échantillons ne peuvent 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
Contrôle négatif sans ADN	Aucune amplification, continuer l'analyse.	Amplification présente, répéter le test.
Contrôle polyclonal	La taille du produit est cohérente avec la taille attendue figurant dans la section 10.1 <i>Taille attendue des produits amplifiés</i> . Aucun réarrangement clonal n'est présent. Continuer l'analyse.	Des réarrangements clonaux sont présents. Répéter le test.
Contrôle positif (Peut aussi être un contrôle d'extraction si le matériel du contrôle positif est soumis à des procédés d'extraction)	La taille du produit est cohérente avec la taille attendue figurant dans la section 10.1 <i>Taille attendue des produits amplifiés</i> . Continuer l'analyse.	Répéter le test.
Specimen Control Size Ladder (Ce contrôle d'amplification est <u>essentiel</u> pour les échantillons de quantité et qualité inconnues.)	Si tous les pics de 96, 197, 297, 397 et 602 nt sont visibles, continuer l'analyse. Dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'obtenir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 602 nt. Continuer l'analyse.	Si aucune bande n'est visible, répéter le test <u>sauf si l'échantillon est positif</u> . Si seulement 1, 2 ou 3 bandes sont visibles, 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 :

- Un ou deux pic(s) positif(s) proéminent(s)^a dans la plage de taille attendue sont interprétés comme :
« **Positif pour la détection de réarrangement(s) clonal(aux) de gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline 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 hémopathie maligne.** »
- Une absence de pic(s) positif(s)^a dans la plage de taille attendue est interprétée comme :
« **Négatif pour la détection de réarrangement(s) clonal(aux) de gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline.** »

^aRemarque : les critères de définition d'un pic positif sont les suivants :

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

9. Limites de la procédure

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

10. Valeurs attendues

10.1. Taille attendue des produits amplifiés

Les tailles des amplicons indiquées ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI. Les tailles d'amplicons visibles 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 utilisée. 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 (master mix)	Cible	Couleur	ADN contrôle	N° de référence	Taille du produit en nucléotides (nt)
IGKTube A	Vκ - Jκ	Bleu	Plage de taille attendue IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880370	120-160, 190-210, 260-300 135-155 ^a 143
IGKTube B	Vκ-K _{de} + intron-K _{de}	Bleu	Plage de taille attendue IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880370	210-250, 270-300, 350-390 225-245, 265-285, 404 ^{a,b} 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Différents gènes	Bleu	Plage de taille attendue IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397, 602^c 96, 197, 297, 397, 602 ^c

^aRemarque : la distribution normale des réarrangements du gène IGK est fortement tronquée en raison de la diversité de jonction limitée. Veuillez consulter l'article de Rock *et al.* pour des explications détaillées.⁴

^bRemarque : dans des conditions sous-optimales, un produit non spécifique de 404 nt peut être détecté dans le Tube B. Afin de différencier un produit spécifique d'un produit non spécifique, l'ADN contrôle négatif ne doit pas révéler cette bande avec la même analyse. Si un pic est présent, il faut alors le considérer comme un pic non spécifique.

^cRemarque : dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'obtenir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 602 nt. Pour la détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI, le pic de 602 nt peut ne pas apparaître au cours des durées de réaction normales. En outre, la taille de ce pic peut différer de 30 nt lorsque la taille du fragment est extrapolée à l'aide des GeneScan - 400HD [ROX] marqueurs de taille.

10.2. Données de l'échantillon

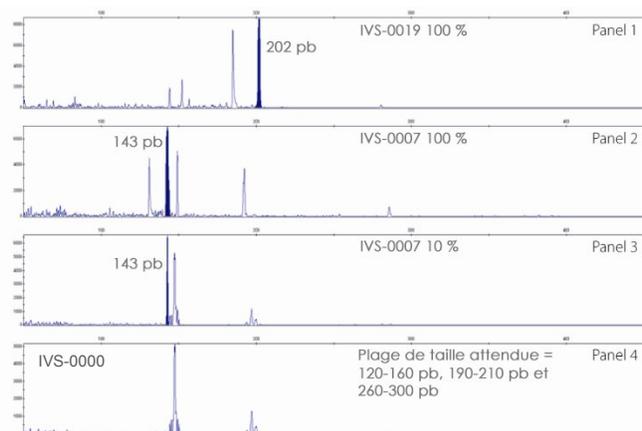


Figure 2. IGK Tube A

Les données figurant à gauche ont été obtenues avec les mélanges réactionnels indiqués. Les produits amplifiés ont été analysés sur un instrument ABI.

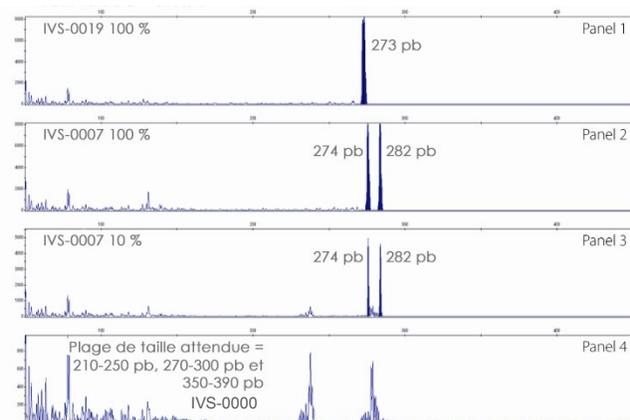


Figure 3. IGK Tube B

Les données figurant à gauche ont été obtenues avec les mélanges réactionnels indiqués. Les produits amplifiés ont été analysés sur un instrument ABI.

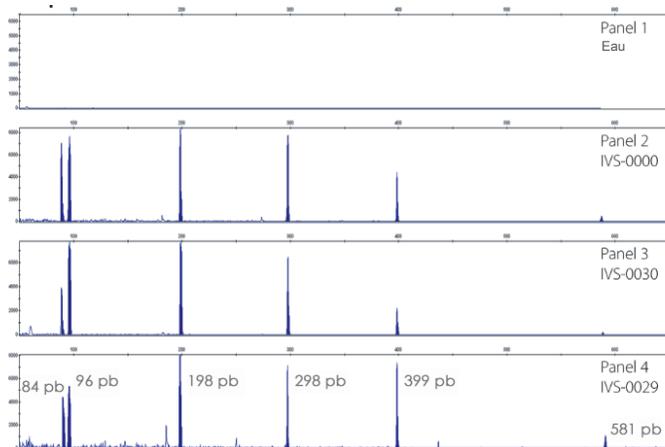


Figure 4. Le mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder.

11. Caractéristiques de performance

Ce test PCR IdentiClone *IGK* Gene Clonality est une procédure rapide et fiable qui est bien plus sensible que l'analyse Southern Blot (SB) dans la détection de clonalité chez les patients suspectés d'être atteints de syndromes lymphoprolifératifs. Le diagnostic clinico-histopathologique final est bien corrélé aux résultats PCR chez un nombre plus élevé de patients en comparaison avec les résultats du SB.^{2,3}

Tableau 9. Études de concordance

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

Tableau 10. PCR par rapport à l'analyse SB concernant l'histopathologie et le diagnostic final

	Concordance PCR/SB :	Sensibilité de la PCR :	Sensibilité de l'analyse SB :
<i>IGH + IGK</i> :	85 %	98 %	39 %
<i>TCRB</i> :	85 %	96 %	35 %

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

12. Bibliographie

1. Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Mol. Diag.* 1999, **4(2)**:101-117.
2. Van Dongen, JJM *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003, **17(12)**:2257-2317.
3. Sandberg, Y, van Gastel-Mol, EJ, Verhaaf, B, Lam, KH, van Dongen, JJM, Langerak, AW. BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern Blot analysis in routine clonality diagnostics. *J. Mol. Diag.* 2005, **7(4)**:495-503.
4. Rock, EP, Sibbald, PR, Davis, MM, Chein, YH. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med.* 1994, **179(1)**:323-328.
5. van Krieken, JHJM, *et al.* Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007, **21(2)**:201-206.

13. Support technique et service client

Coordonnées



Invivoscribe, Inc

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

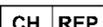
Téléphone: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Heures d'ouverture: 7 h – 17 h heure du Pacifique

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

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

14. Symboles

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

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

15. Informations légales

15.1. Garantie et responsabilité

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) s'engage à fournir des produits de la plus haute qualité. Invivoscribe® garantit que les produits respectent ou dépassent les normes de performance décrites dans les instructions 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®.

©2023 Invivoscribe, Inc. Tous droits réservés. Les marques commerciales mentionnées dans ce document sont la propriété d'Invivoscribe, Inc. et/ou de ses filiales, ou (en ce qui concerne les marques commerciales d'autres détenteurs figurant dans ce document) de leurs propriétaires respectifs.