

Notice d'Utilisation

CE IVD

IdentiClone® *TCRB* Gene Clonality Assay

Pour l'Identification de Réarrangements Clonaux de Gène de Chaîne Bêta de Récepteur de Cellule T.

IVD Pour le Diagnostic *In Vitro*🔑 Conditions de Conservation: **-85°C to -65°C**

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

| Catalogue N° | Produits | Quantité |
|---------------------|--|---------------|
| REF 92050010 | IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay – Gel Detection | 33 Réactions |
| REF 92050020 | IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay MegaKit – Gel Detection | 330 Réactions |

Table des Matières

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1. | INDICATIONS | 3 |
| 2. | RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST | 3 |
| 2.1. | Contexte | 3 |
| 2.2. | Résumé | 3 |
| 3. | PRINCIPES DE LA PROCÉDURE | 4 |
| 3.1. | Polymerase Chain Reaction (PCR)..... | 4 |
| 3.2. | Détection sur Gel..... | 4 |
| 4. | RÉACTIFS | 5 |
| 4.1. | Composition des Réactifs | 5 |
| 4.2. | Avertissements et Précautions | 6 |
| 4.3. | Conservation et Manipulation..... | 6 |
| 5. | INSTRUMENTS | 7 |
| 5.1. | Thermocycleur..... | 7 |
| 5.2. | Unité d'Electrophorèse | 7 |
| 5.3. | Unité à radiation UV..... | 7 |
| 6. | COLLECTE DES PRELEVEMENTS ET PREPARATION | 8 |
| 6.1. | Précautions | 8 |
| 6.2. | Substances Interférentes | 8 |
| 6.3. | Conditions des prélèvements et Manipulations..... | 8 |
| 6.4. | Préparation des échantillons | 8 |
| 6.5. | Conservation des échantillons | 8 |
| 7. | PROCÉDURE D'ANALYSE | 9 |
| 7.1. | Matériels Fourni | 9 |
| 7.2. | Matériels Requis (non fourni)..... | 9 |
| 7.3. | Préparation du Réactif | 10 |
| 7.4. | Amplification..... | 11 |
| 7.5. | Détection sur Gel – Analyse d'Heteroduplex | 12 |
| 7.6. | Contrôle Qualité | 12 |
| 7.7. | Contrôles Positifs Recommandés | 12 |
| 8. | INTERPRETATION DES RESULTATS | 13 |
| 8.1. | Analyse..... | 13 |
| 8.2. | Interprétation de l'Echantillon | 13 |
| 9. | LIMITES DE LA PROCÉDURE | 14 |
| 10. | VALEURS ATTENDUES | 14 |
| 10.1. | Taille Attendue des Produits Amplifiés..... | 14 |
| 10.2. | Données de l'échantillon | 15 |
| 11. | CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE | 16 |
| 12. | SERVICE TECHNIQUE ET CLIENT | 16 |
| 13. | RÉFÉRENCES | 17 |
| 14. | SYMBOLES CLÉS UTILISÉS | 17 |
| 15. | INFORMATIONS LÉGALES | 17 |
| 15.1. | Garantie et responsabilité | 17 |
| 15.2. | Brevets et Marques | 17 |
| 15.3. | Avis à l'acheteur - EagleTaq DNA Polymerase UNIQUEMENT | 17 |

1. Indications

L'IdentiClone *TCRB* Gene Clonality Assay (Test de Clonalité Génique) est un produit de diagnostic *in vitro* destiné à la détection basée sur Réaction en Chaîne de la Polymérase (PCR, Polymerase Chain Reaction) des réarrangements clonaux de gène de chaîne bêta de récepteur de cellule T chez les patients à lymphoproliférations suspectes. Spécifiquement, le test *TCRB* Gene Clonality Assay peut être utilisé pour:

- Identifier la clonalité de lymphoproliférations suspectes
- Soutenir un diagnostic différentiel entre des lésions réactives et des malignités de lignée T ou des malignités immatures de lignées B
- Déterminer l'implication de la lignée dans les syndromes lymphoprolifératifs matures
- Contrôler et évaluer la récurrence de la maladie

2. Résumé et Explication du Test

2.1. Contexte

Les réarrangements des gènes du récepteur à antigène se produisent pendant l'ontogenèse dans les lymphocytes B et T. Ces réarrangements de gènes génèrent des produits uniques en longueur et en séquence pour chaque cellule. Ainsi, les tests d'amplification PCR peuvent être utilisés pour identifier les populations de lymphocytes issues d'une seule cellule en détectant les réarrangements uniques de gène V-J présents dans les loci du gène du récepteur d'antigène.¹ Ce test PCR IdentiClone contient des amorces ADN à consensus multiples qui ciblent les régions génétiques conservées de la chaîne bêta de récepteur de cellule T. Ce test est utilisé pour détecter à partir de l'ADN la vaste majorité des malignités clonales à cellule T. Les produits des tests peuvent être analysés avec une variété de formats de détection, parmi lesquels les électrophorèses sur gel et capillaires.

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

2.2. Résumé

Les tests InvivoScribe IdentiClone représentent une nouvelle approche de l'analyse de clonalité basée sur PCR. Ces tests standardisés ont été soigneusement optimisés en testant des échantillons de contrôles positifs et négatifs avec des mélanges réactionnels "Master Mixes" multiplex. Le développement des tests a été suivi d'une validation importante comprenant l'analyse de plus de 400 échantillons cliniques de la classification REAL (Revised European American Lymphoma). L'analyse a été réalisée à travers l'Europe dans plus de 30 centres d'analyse importants et indépendants dans une étude collaborative connue sous le nom d'Action Concertée BIOMED-2. Les résultats de cette étude BIOMED-2 sont publiés dans *Leukemia*, revue à comité de lecture reconnue.²

Les tests basés sur une détection sur Gel ne peuvent détecter de manière fiable les populations clonales représentant moins de 5% de la population cellulaire lymphocytaire totale. Il est important de rappeler que les résultats des tests moléculaires de clonalité doivent toujours être interprétés dans le contexte des données cliniques, histologiques et immunologiques.

Ce kit de test contient 4 master mixes. Les *TCRB* Tubes A et B ciblent les régions charpente "framework" dans la région variable et la région de jonction du locus de la chaîne *TCR* bêta. Le *TCRB* Tube C cible les régions de diversité et de jonction. Enfin, le "Specimen Control Size Ladder master mix", cible plusieurs gènes et génère une série d'amplicons approximativement de 100, 200, 300, 400, et 600 paires de bases afin d'assurer que l'ADN introduit est présent en qualité et quantité 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. Ceci améliore la cohérence et facilite l'apprentissage croisé d'une large gamme de tests différents.

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



3. Principes de la Procédure

3.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les analyses PCR sont utilisées en routine pour l'identification des populations clonales de cellules T. Ces tests amplifient l'ADN entre les amorces qui ciblent les régions variable (V) et de jonction (J) conservées (*TCRB* Tube A & B), ainsi que les régions de diversité (D) et de jonction (*TCRB* Tube C). Ces régions conservées s'étendent de chaque côté d'un locus de la région V-J où des réarrangements génétiques programmés interviennent pendant la maturation de tous les lymphocytes B et T. Les gènes du récepteur à antigène qui subissent un réarrangement sont les gènes de chaîne lourde et des chaînes légères d'immunoglobulines des cellules B et les gènes de récepteurs des cellules T. Chaque cellule B et T a un seul réarrangement productif V-J unique en longueur et séquence. Par conséquent, lorsque l'ADN d'une population normale ou polyclonale est amplifié avec des amorces d'ADN flankant la région V-J, une courbe en cloche (distribution gaussienne) des produits d'amplification est obtenue dans une gamme de taille attendue. Cette distribution gaussienne reflète la population hétérogène des réarrangements V-J. (Dans certains cas, lorsqu'il y a absence d'ADN de lymphocyte, aucun produit n'est visible). Pour l'ADN d'échantillons contenant une population clonale, le rapport est de un ou deux produits amplifiés (amplicons) proéminents parmi un fond polyclonal réduit.



Tube A: 23 V β primers + 6 J β 1 primers and 3 J β 2 primers

Tube B: 23 V β primers + 4 J β 2 primers

Tube C: 2 D β primers + 13 J β primers

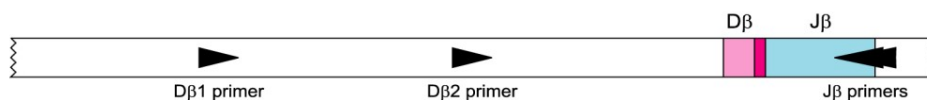


Figure 1. Ci-dessus, un diagramme simplifié d'un gène représentatif réarrangé de récepteur bêta de cellule T sur le chromosome 7 (7q35) montrant le positionnement approximatif des amorces ADN amont et aval. Le nombre d'amorces et leur spécificité sont donnés pour les "master mixes" Tubes A, B, et C.

Puisque les gènes des récepteurs d'antigène sont polymorphiques (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 N-région et les mutations somatiques modifient encore plus les séquences ADN de ces régions. Par conséquent, des "Master Mixes multiplex", ciblant plusieurs régions FR, sont nécessaires à l'identification de la majorité des réarrangements clonaux. Comme indiqué, les réarrangements clonaux sont identifiés comme proéminents, produits de taille unique parmi le fond des produits d'amplification de tailles variables qui forment une distribution gaussienne autour d'une taille moyenne d'un réarrangement statistiquement majoritaire.

3.2. Détection sur Gel

Le gel d'électrophorèse, comme celui d'agarose ou le gel d'électrophorèse non dénaturant de polyacrylamide (PAGE), est communément employé pour séparer les différents produits d'amplification selon leur taille, leur charge et leur conformation. En effet, l'ADN étant chargé négativement, lorsqu'un potentiel électrique (une tension) est appliqué au gel contenant les produits de PCR, le champ électrique entraîne la migration des amplicons à travers le gel. Les plus petits fragments d'ADN sont capables de migrer facilement dans la matrice du gel, alors que les plus grands fragments d'ADN migrent plus lentement. Ceci entraîne la séparation des amplicons en fonction de leur taille. Le bromure d'éthidium ou un autre colorant intercalant de l'ADN peut alors être utilisé pour colorer et détecter ces produits dans le gel.

Une analyse d'hétéroduplex peut aussi être réalisée et faite en gel de polyacrylamide pour différencier les produits de PCR clonaux des non-clonaux. Une analyse d'hétéroduplex consiste en une dénaturation des produits de PCR à température élevée, puis en une réhybridation rapide des brins d'ADN par une réduction soudaine de la température. Ceci entraîne un appariement incorrect d'une large portion des brins d'ADN à d'autres brins non homologues créant des boucles dans l'ADN.

Ces boucles causent une réduction significative de l'habilité de l'ADN à migrer à travers le gel de polyacrylamide. Cependant, si la majorité des produits de PCR sont clonaux, lors d'une analyse d'hétéroduplex, la plupart des produits de PCR se réhybrideront correctement avec des brins homologues. Ces produits de PCR passeront normalement dans le gel de polyacrylamide. Ainsi, dans un échantillon clonal avec un fond polyclonal, une analyse d'hétéroduplex mettra en évidence la plupart des produits polyclonaux qui avanceront beaucoup plus lentement dans le gel de polyacrylamide et de ce fait augmentera leur séparation et la capacité à identifier la(es) bande(s) clonale(s).

4. Réactifs

4.1. Composition des Réactifs

Tableau 1. Kits Disponibles





| Número de Catálogo | Producto | Cantidad |
|--|--|---------------|
|  92050010 | IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay – Gel Detection | 33 Reactions |
|  92050020 | IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay MegaKit – Gel Detection | 330 Reactions |

Tableau 2. Composition des Réactifs

| Réactif | N° de référence | Composants des Réactifs (ingrédients actifs) | Quantité unitaire | 92050010 Nb d'Unités | 92050020 Nb d'Unités | Temp. de Conservation |
|--|-----------------|---|-------------------|----------------------|----------------------|--|
| Master Mixes | 22050010CE | <i>TCRB</i> Tube A – Unlabeled Oligonucléotides multiples ciblant les régions V β + J β 1 + J β 2 du gène de chaîne bêta de récepteur de cellules T en solution saline tamponnée. | 1500 μ L | 1 | 10 |  -65°C |
| | 22050020CE | <i>TCRB</i> Tube B – Unlabeled Oligonucléotides multiples ciblant les régions V β + J β 2 du gène de chaîne bêta de récepteur de cellules T en solution saline tamponnée. | 1500 μ L | 1 | 10 | |
| | 22050030CE | <i>TCRB</i> Tube C – Unlabeled Oligonucléotides multiples ciblant les régions D β + J β 1 + J β 2 du gène de chaîne bêta de récepteur de cellules T en solution saline tamponnée. | 1500 μ L | 1 | 10 | |
| Master Mix Témoin d'Amplification | 20960020 | Specimen Control Size Ladder – Unlabeled Oligonucléotides multiples ciblant des gènes domestiques. | 1500 μ L | 1 | 10 | |
| Témoins ADN Positifs | 40880490 | IVS-0009 Clonal Control DNA 200 μ g/mL d'ADN en solution à 1/10 ^{ème} TE | 100 μ L | 1 | 5 |  2°C OU  -85°C |
| | 40880190 | IVS-0004 Clonal Control DNA 200 μ g/mL d'ADN en solution à 1/10 ^{ème} TE | 100 μ L | 1 | 5 | |
| | 40881210 | IVS-0021 Clonal Control DNA 200 μ g/mL d'ADN en solution à 1/10 ^{ème} TE | 100 μ L | 1 | 5 | |
| Témoin ADN Négatif (Normal) | 40920010 | IVS-0000 Polyclonal Control DNA 200 μ g/mL d'ADN en solution à 1/10 ^{ème} TE | 100 μ L | 1 | 5 | |

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

4.2. Avertissements et Précautions

- **IVD** Ce produit est pour le Diagnostic In Vitro.
- Le kit d'analyse devrait être employé dans son ensemble. N'échangez pas les réactifs avec ceux d'un autre fabricant. Une dilution réduisant les volumes de réaction d'amplification, ou tout autre déviation dans ce protocole peut affecter la performance de ce test et/ou annuler toute sous-licence limitée attribuée par l'achat de kit d'analyse.
- Les matériels sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés comme indiqué. Ne pas utiliser les kits au delà de leur date de péremption.
- Un suivi proche du protocole assurera une performance optimale et reproductible. Une précaution doit être prise pour assurer l'utilisation du programme correct du thermocycleur, 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 ayant des numéros de lots différents.
- Il est rappelé au personnel de laboratoire de porter un équipement de protection individuelle (EPI) approprié et de suivre les bonnes pratiques de laboratoire et les précautions universelles lors de la manipulation de prélèvements. Les prélèvements doivent être manipulés dans des installations de confinement de sécurité biologique approuvées et doivent être ouverts uniquement dans une enceinte de sécurité biologique certifiée. Il est recommandé d'utiliser de l'eau déionisée de qualité de biologie moléculaire dans la préparation du prélèvement d'ADN.
- De par la sensibilité analytique de ce test, une attention extrême doit être prise pour éviter la contamination des réactifs ou des mélanges d'amplification avec des échantillons, des contrôles ou des matériels amplifiés. Tous les réactifs doivent être attentivement surveillés pour tout signe de contamination (e.g., contrôles négatifs donnant des signaux positifs). Jeter les réactifs suspectés de contamination.
- Afin de minimiser la contamination, porter des gants propres lors de la manipulation d'échantillons et de réactifs et nettoyer fréquemment les plans de travail et les pipettes avant de réaliser la PCR.
- L'autoclavage n'élimine pas l'ADN issu d'une contamination. La progression du travail au laboratoire PCR doit toujours se faire en sens unique entre des zones de travail séparées; en commençant par la préparation des Master Mixes, suivi de la préparation des prélèvements, puis l'Amplification et enfin la Détection. N'introduisez aucun ADN amplifié dans les zones désignées pour la préparation des Master Mixes ou des prélèvements.
- Toutes les pipettes, les cônes de pipettes et tout équipement utilisé dans une zone particulière doivent être consacrés à et gardés pour cette zone du laboratoire.
- Des plastiques stériles et protections jetables doivent être utilisés dans la mesure du possible pour éviter une contamination de RNase, DNase ou croisée.

4.3. Conservation et Manipulation

- Pour tout délai autre que celui d'une utilisation immédiate, **les kits d'analyse doivent être conservés entre -85°C et -65°C.**
- La température optimale de conservation des ADN contrôles est de 2°C à 8°C, mais les ADN contrôles peuvent être conservés entre -85°C et -65°C.
- Tous les réactifs et contrôles doivent être décongelés et vortexés ou mélangés avec minutie avant utilisation pour assurer qu'ils sont complètement re-suspendus.
- Les matériels sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée si conservés et manipulés comme indiqué. N'utilisez pas les kits au delà de leur date de péremption.
- A cause de concentrations en sels élevées, les Master Mixes PCR sont sensibles aux cycles de congélation/décongélation. Aliquoter si nécessaire les Master Mixes en cryotubes à bouchon à vis avec joint.

5. Instruments

5.1. Thermocycleur

- Utilisation ou Fonction: Amplification d'échantillons d'ADN
- Instrument suggéré: thermocycleur Veriti™ Dx ou équivalent
- Caractéristiques de Performance et Spécification:
 - Gamme de Température Minimale: 15°C à 96°C
 - Vitesse Minimale de Montée en Température: 0,8°C/sec
- Suivre les procédures d'installation, d'opération, de calibration et de maintenance du fabricant.
- Voir section 7.4 *Amplification* pour le programme du thermocycleur.

5.2. Unité d'Electrophorèse

- Utilisation ou Fonction: Séparation de fragment d'ADN
- Caractéristiques de Performance et Spécification:
 - Capable de fonctionner à 35V et 135V pendant des durées prolongées
- Suivre les procédures d'installation, d'opération, de calibration et de maintenance du fabricant.

5.3. Unité à radiation UV

- Utilisation ou Fonction: Détection de l'ADN
- Caractéristiques de Performance et Spécification:
 - Capable d'émettre une radiation à une longueur d'onde de ~302 nm
- Suivre les procédures d'installation, d'opération, de calibration et de maintenance du fabricant.

6. Collecte des prélèvements et préparation

6.1. Précautions

Les prélèvements biologiques humains peuvent contenir des matériels potentiellement infectieux. Tous les prélèvements doivent être manipulés conformément au standard AESST (OSHA) des agents pathogènes transmissibles par le sang (APTS) ou au Niveau 2 de Sécurité Biologique.

6.2. Substances Interférentes

Les substances suivantes sont connues pour interférer avec la PCR:

- Cations divalents chélateurs
- Cônes de pipette à rétention minimale
- EDTA (non significatif à faible concentration)
- Héparine

6.3. Conditions des prélèvements et Manipulations

Ce test analyse l'**ADN génomique** d'origines suivantes:

- 5 cc de sang périphérique, biopsie médullaire ou ponction sternale de la moelle osseuse anti-coagulée avec de l'héparine ou de l'EDTA (conservé entre 2°C et 8°C et expédié à température ambiante)
- 5 mm cube 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 à la Formaline et inclus en paraffine (conservés et expédiés à température ambiante)

6.4. Préparation des échantillons

Extraire l'ADN génomique des prélèvements du patient dès que possible. Resuspendre l'ADN à une concentration finale de 100 µg à 400 µg par mL dans 1/10^{ème} de TE (1 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) ou dans de l'eau de qualité de biologie moléculaire ou stérile USP. C'est un système d'analyse sensible. Une large gamme de concentrations d'ADN génèrera un résultat fiable. Par conséquence, quantifier et ajuster les concentrations d'ADN n'est généralement pas nécessaire. L'analyse de l'échantillon d'ADN avec le *Specimen Control Size Ladder Master Mix* assurera qu'un ADN de quantité et qualité suffisante était présent pour produire un résultat fiable.

6.5. Conservation des échantillons

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

7. Procédure d'Analyse

7.1. Matériels Fourni

Tableau 3. Matériels Fournis

| N° de référence | Description |
|-----------------------|--|
| REF 22050010CE | <i>TCRB</i> Tube A – Unlabeled |
| REF 22050020CE | <i>TCRB</i> Tube B – Unlabeled |
| REF 22050030CE | <i>TCRB</i> Tube C – Unlabeled |
| REF 20960020 | Specimen Control Size Ladder – Unlabeled |
| REF 40880490 | IVS-0009 Clonal Control DNA |
| REF 40881210 | IVS-0021 Clonal Control DNA |
| REF 40880190 | IVS-0004 Clonal Control DNA |
| REF 40920010 | IVS-0000 Polyclonal Control DNA |

7.2. Matériels Requis (non fourni)

Tableau 4. Matériels Requis (non fourni)

| Réactif/Matériau | Réactifs Recommandés/Matériaux et Fournisseurs | N° de référence | Notes |
|--|---|-------------------------------|---|
| ADN Polymerase | Roche: <ul style="list-style-type: none"> EagleTaq ADN Polymerase ou Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> Eagle Taq DNA Polymerase¹ ou équivalent | 05206944190 ou 60970100 | S.O. |
| Eau Distillée Déionisée de Biologie Moléculaire | S.O. | S.O. | DNase / RNase exempts |
| Pipettes Calibrées | Rainin: <ul style="list-style-type: none"> Pipettes P-2, P-20, P-200 and P-1 000 Ou pipettes SL-2, SL-20, SL-200 and SL-1 000 | S.O. | Doit être capable de mesurer précisément des volumes allant de 1µl à 1 000µl. |
| 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 or PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer <ul style="list-style-type: none"> PE 9600 or PE 9700 | S.O. | S.O. |
| Vortex | S.O. | S.O. | S.O. |
| Plaques ou tubes PCR | S.O. | S.O. | Sterile |
| Cônes de pipette à filtre | S.O. | S.O. | Stérile, exempts de RNase/DNase/Pyrogen- |
| Tubes Microcentrifuges | S.O. | S.O. | Stériles |
| Gel Electrophoresis Unit | S.O. | S.O. | Pour gels de polyacrylamide |
| Ethidium Bromide | Invitrogen: <ul style="list-style-type: none"> UltraPure™ 10 mg/mL Ethidium Bromide | 15585-011 | S.O. |

Tableau 4. Matériaux Requis (non fourni)

| Réactif/Matériau | Réactifs Recommandés/Matériaux et Fournisseurs | N° de référence | Notes |
|-------------------------------|--|---------------------|---|
| 6% Polyacrylamide Gels | Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Novex® TBE Gels (6%, 12 well) | EC62652Box | S.O. |
| TBE Running Buffer | Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Novex TBE Running Buffer (5X) | LC6675 | Diluer au 1:5 ^{ème} avant utilisation. |
| Gel Loading Buffer | Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer Novex Hi-Density TBE Sample Buffer (5X) | 10816-015 LC6678 | S.O. |

Remarque: Ce produit est destiné uniquement à la vente et à l'utilisation dans l'Espace économique européen. Il ne doit pas être revendu ou transféré à une autre partie

7.3. Préparation du Réactif

- Tous les échantillons inconnus doivent être analysés avec le “Specimen Control Size Ladder Master Mix”. Ceci pour s’assurer qu’il n’y a pas d’inhibiteur d’amplification présent et que l’ADN est en qualité et quantité suffisante pour générer des résultats fiables.
- Une seul résultat par échantillon est acceptable; cependant, nous recommandons de dupliquer chaque échantillon dans la mesure du possible. Si l’analyse dupliquée fournit des résultats incohérents, une nouvelle analyse ou réévaluation de l’échantillon est nécessaire.
- Les contrôles Positif, Négatif et Témoin Négatif PCR sans ADN (No Template Control, NTC) doivent être testés pour chaque Master Mix.
- Il est recommandé de grouper plusieurs échantillons dans la même série d’analyse afin d’éviter que le contrôle négatif (IVS-0000 Polyclonal Control DNA) ne s’épuise. Si le groupement des échantillons n’est pas possible dans votre laboratoire, IVS-0000 Polyclonal Control DNA est également disponible à l’achat séparément.

7.3.1. Après vous être muni de gants, enlever les Master Mixes du congélateur. Laisser les tubes décongeler complètement; puis vortexer doucement pour mélanger.

7.3.2. Sous la hotte de préparation des réactifs, aliquoter un volume approprié de chaque Master Mix en tube Microcentrifuge propre et stérile.

- Les volumes d’aliquots doivent être de 45 µL pour chaque réaction.
 - Ajouter une réaction supplémentaire toutes les 15 réactions pour corriger les erreurs de pipetage. Ainsi, pour chaque Master Mix (excepté pour le Specimen Control Size Ladder), le nombre de réactions (**n**) doit être:
- | | |
|-----------------------------------|--|
| n = 2 × Nbre d’échantillon | (tester chaque échantillon en double) |
| + 1 | ADN contrôle positif (Voir Tableau 6) |
| + 1 | ADN contrôle négatif (IVS-0000 Polyclonal Control DNA) |
| + 1 | Témoin négatif PCR sans ADN (eau) |
| + 1 | pour corriger l’erreur de pipetage |

n = 2 × Nbre d’échantillon + 4 Total

- Le volume total d’aliquote pour chaque Master Mix doit être **n × 45 µL**.
- Pour le Master Mix du Specimen Control Size Ladder Marquer, le nombre de réactions (**m**) doit être:

| | |
|-------------------------------|--|
| m = Nbre d’échantillon | (tester chaque échantillon une seuls fois) |
| + 1 | ADN contrôle négatif (IVS-0000 Polyclonal Control DNA) |
| + 1 | Témoin négatif PCR sans ADN (eau) |
| + 1 | pour corriger l’erreur de pipetage |

m = Nbre d’échantillon + 3 Total

- Le volume total d’aliquote pour le Master Mix du Specimen Control Size Ladder doit être **m × 45 µL**.

- 7.3.3. **Pour les *TCRB* Tubes A et B:** Ajouter 2,25 unités (ou 0,45 µL à 5 unités/µL) d'ADN polymérase Taq à chaque Master Mix par réaction.
- L'ADN polymérase Taq totale ajoutée à chaque Master Mix doit être de **n × 0,45 µL**.
 - Vortexer doucement pour mélanger.
- 7.3.4. **Pour le *TCRB* Tube C et le Specimen Control Size Ladder:** Ajouter 1,25 unités (ou 0,25µL à 5 unités/µL) d'ADN polymérase Taq à chaque Master Mix par réaction.
- L'ADN polymérase Taq totale ajoutée à chaque Master Mix doit être de **n × 0,25 µL** pour le Master Mix du *TCRB* Tube C et **m × 0,25 µL** pour le Master Mix du Specimen Control Size Ladder.
 - Vortexer doucement pour mélanger.
- 7.3.5. Pour chaque réaction, aliquoter 45 µL du Master Mix approprié + la solution d'ADN polymérase dans les puits individuels d'une plaque ou dans un tube PCR.
- 7.3.6. Ajouter 5µl de matrice appropriée (échantillon d'ADN, ADN contrôle positif, ADN contrôle négatif, ou eau) aux puits individuels contenant les solutions de Master Mix respectives. Aspirer et refouler plusieurs fois pour mélanger.
- 7.3.7. Reboucher ou couvrir la plaque PCR.
- Les échantillons sont maintenant prêts à être amplifiés dans le thermocycleur.
- 7.3.8. 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.

Résumé

Pour chaque Master Mix et **n** réactions, mélanger:

| | |
|---------------------------------|----------------------|
| n × 45 µL | de Master Mix |
| n × 0,25 µL ou 0,45 µL * | d'ADN polymérase Taq |

Vortexer doucement pour mélanger.

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

Ajouter **5 µL** de matrice appropriée dans chaque puit

Volume Total de réaction = 50 µL

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

7.4. Amplification

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

Tableau 5. Conditions de cyclage thermique

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

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

7.5. Détection sur Gel – Analyse d’Hétéroduplex

Remarque: Ne pas analyser par hétéroduplex les produits de PCR du master mix du Specimen Control Size Ladder. Sauter les étapes 7.5.1 à 7.5.3 et passez directement à l’étape 7.5.4.

- 7.5.1. Dénaturer 20 µL de produits PCR à 94°C pendant 5 minutes.
- 7.5.2. Refroidir rapidement pour réhybrider les produits de PCR à 4°C (dans un bain d’eau glacée) pendant 60 minutes.
- 7.5.3. Préparer l’unité d’électrophorèse avec un gel de polyacrylamide TBE à 6% non dénaturant et un tampon de migration 1X TBE.
- 7.5.4. Mélanger 20 µL de chaque échantillon avec 5 µL de tampon de charge non dénaturant de bleu de bromophénol 5X réfrigéré.
- 7.5.5. Déposer les 20 µL de mélange dans les puits individuels du gel.
- 7.5.6. Brancher le gel à 110V pendant 2-3 heures ou 40-50V toute une nuit. La tension et la durée de l’électrophorèse dépendent de la taille de l’amplicon de PCR et de l’épaisseur du gel de polyacrylamide. La tension et le temps de migration peuvent être ajustés en conséquence.
- 7.5.7. Colorer les gels dans 0,5µg/mL de bromure d’éthidium (dans de l’eau ou du tampon 0,5X TBE) pendant 5-10 minutes.
- 7.5.8. Rincer les gels dans de l’eau pendant 5-10 minutes. Changer l’eau et recommencer.
- 7.5.9. Placer le gel sous lampes UV pour visualiser les bandes.
- 7.5.10. Photographier et interpréter les résultats. (voir sections 8 : *Interprétation des Résultats* et 10 : *Valeurs Attendues* ci-dessous.)

7.6. Contrôle Qualité

Les contrôles positifs et négatifs (ou normaux) sont fournis avec le kit et doivent être analysés une seule fois chaque fois que l’analyse est réalisée pour assurer une performance correcte de l’analyse. De plus, un blanc (*e.g.* eau) doit aussi être inclus pour tester la contamination du Master Mix ou la contamination croisée des réactions PCR due à une technique stérile incorrecte. Un contrôle tampon peut aussi être ajouté pour assurer qu’il n’y a pas de contamination du tampon employé pour resuspendre 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 listées sont déterminées en utilisant une plateforme ABI.

Tableau 6. Contrôles Positifs Recommandés

| Mélange mère | Cible | Control DNA | N°de référence | Taille du Produit (pb) |
|-------------------------------------|----------------|--|----------------|--|
| TCRB Tube A | Vβ + Jβ1/2 | Taille Attendue IVS-0009 Clonal Control DNA | --- | 240 - 285 264 |
| TCRB Tube B | Vβ + Jβ2 | Taille Attendue IVS-0004 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA | --- | 240 - 285 253 267 |
| TCRB Tube C | Dβ + Jβ1/2 | Taille Attendue IVS-0009 Clonal Control DNA | --- | 170 - 210 (Dβ2), 285 - 325 (Dβ1) 309 |
| Specimen Control Size Ladder | Multiple Genes | Taille Attendue IVS-0000 Polyclonal Control DNA | --- | 100, 200, 300, 400, 600^a 100, 200, 300, 400, 600 ^a |

Remarque: Parce que les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n’est pas rare d’avoir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 600 pb.

8. Interprétation des Résultats

Bien que des résultats positifs soient hautement suggestifs de malignité, les résultats positifs et négatifs devraient être interprétés dans le contexte de toute information clinique et des résultats des tests de laboratoires. La gamme de taille de chaque Master Mix a été déterminée en testant les échantillons contrôles négatifs et positifs. Pour une interprétation précise et significative il est important d'ignorer les pics qui sont en dehors de la gamme de taille attendue de chaque Master Mix.

8.1. Analyse

- Les échantillons qui échouent à l'amplification après des essais répétés doivent être déclarés comme suit "Aucun résultat ne peut être donné sur ce prélèvement parce qu'il contenait de l'ADN en quantité ou qualité insuffisante pour analyse".
- Les échantillons qui sont négatifs doivent être répétés si la réaction du contrôle positif a échoué.
- Si des échantillons testés en double conduisent à des résultats différents, ils doivent être re-testés et/ou re-évalués au cas où les échantillons auraient été mélangés.
- Tous les contrôles des tests doivent être examinés avant l'interprétation des résultats des échantillons.

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

| Type de Contrôle | Résultats Attendus | Résultats Aberrants |
|---|---|---|
| Contrôle négatif sans ADN | Aucune amplification, continuer l'analyse | Amplification présente, refaire l'analyse. |
| Contrôle polyclonal | La taille du produit est cohérente avec la taille attendue listée dans la section <i>10.1 Taille Attendue des Produits Amplifiés</i> . Aucun réarrangement clonal n'est présent. Continuer l'analyse. | Des réarrangements clonaux sont présents. Refaire l'analyse. |
| Contrôle positif (Peut aussi être un contrôle d'extraction si le matériel du contrôle positif est prélevé par un procédé d'extraction) | La taille du produit est cohérente avec la taille attendue listée dans la section <i>10.1 Taille Attendue des Produits Amplifiés</i> . Continuer l'analyse. | Le produit ne correspond pas à la taille attendue. Refaire l'analyse. |
| Specimen Control Size Ladder (Ce contrôle d'amplification est <u>essentiel</u> pour les échantillons de quantité et qualité inconnues.) | Si tous les pics de 100, 200, 300, 400, et 600pb sont visibles, continuer l'analyse. Parce que des fragments d'ADN plus petits sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare pour le fragment 600pb d'avoir un signal diminué ou complètement absent. Continuer l'analyse. | Si aucune bande n'est visible, refaire l'analyse <u>sauf si le prélèvement est positif</u> . Si seulement 1, 2, ou 3 bandes sont visibles, re-évaluer l'échantillon pour la dégradation de l'ADN <u>sauf si le prélèvement est positif</u> . |

8.2. Interprétation de l'Echantillon

Considérant que les contrôles produisent les résultats attendus, les échantillons cliniques doivent être interprétés comme suit:

- Une ou deux bande(s) positive(s) proéminente(s)^a dans la gamme de taille attendue est interprété comme:
“Positif pour la détection de réarrangement(s) clonal(aux) de gène de chaîne bêta de récepteur de cellule T cohérent avec la présence d'une population cellulaire clonale. Dans le contexte d'un critère de diagnostic global, les populations cellulaires clonales peuvent indiquer la présence de malignité hématologique.”
- Une absence de bande(s) positive(s)^a dans la gamme de taille attendue est interprété comme:
“Négatif pour la détection de réarrangement(s) clonal(aux) de gène de chaîne bêta de récepteur de cellule T.”

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

- Les produits des échantillons tombant dans la gamme de taille attendue et produisant une(des) bande(s) séparée(s) distincte(s) de toute traînée ("smear") de fond est(sont) cohérente(s) avec une(des) bande(s) positive(s).

9. Limites de la Procédure

- Ce test n'identifie pas 100% des populations cellulaires clonales.
- Ce test ne peut détecter de manière fiable moins de 5 cellules positives pour 100 cellules normales.
- Les résultats de tests de clonalité moléculaire doivent toujours être interprétés dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.
- Les analyses basées sur la 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 listées ont été déterminées avec une plateforme ABI.

Table 8. Expected Size of Amplified Products

| Mélange mère | Cible | ADN Contrôle | N° de référence | Taille du Produit (pb) ^b |
|-------------------------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------|---|
| TCRB Tube A | Vβ + Jβ1/2 | Taille Attendue | --- | 240 - 285 |
| | | IVS-0000 Polyclonal Control DNA | 40920010 | 240 - 285, 271 ^a |
| | | IVS-0009 Clonal Control DNA | 40880490 | 264 |
| | | IVS-0004 Clonal Control DNA | 40880190 | 295 |
| TCRB Tube B | Vβ + Jβ2 | Taille Attendue | --- | 240 - 285 |
| | | IVS-0000 Polyclonal Control DNA | 40920010 | 240 - 285, 221 ^b |
| | | IVS-0009 Clonal Control DNA | 40880490 | --- |
| | | IVS-0004 Clonal Control DNA | 40880190 | 253 |
| TCRB Tube C | Dβ + Jβ1/2 | Taille Attendue | --- | 170 - 210 (Dβ2), 285 - 325 (Dβ1) |
| | | IVS-0000 Polyclonal Control DNA | 40920010 | 128 ^b , 170 - 210, 285-325, 337 ^b |
| | | IVS-0009 Clonal Control DNA | 40880490 | 309 |
| | | IVS-0004 Clonal Control DNA | 40880190 | 295 |
| Specimen Control Size Ladder | Gènes Multiples | Taille Attendue | --- | 100, 200, 300, 400, 600^c |
| | | IVS-0000 Polyclonal Control DNA | 40920010 | 100, 200, 300, 400, 600 ^c |

^a**Remarque:** La bande de 271 pb est particulièrement visible dans les échantillons contenant peu de cellules lymphoïdes contaminantes.

^b**Remarque:** Dans des conditions sous-optimales un produit aspécifique de 221 pb (*TCRB* Tube B), 128 et 337 pb (*TCRB* Tube C) peuvent être détectés. Si présentes, ces bandes sont normalement faibles.

^c**Remarque:** Parce que les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'avoir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 600 pb.

10.2. Données de l'échantillon

Les données montrées ci-dessous ont été produites avec les Master Mixes indiqués. Les produits amplifiés ont été analysés en hétéroduplex et passés dans un gel de polyacrylamide à 6%. ("Valid Size Range" = Taille Attendue, "basepairs (bp)" = paires de bases (pb), "lane" = couloir).

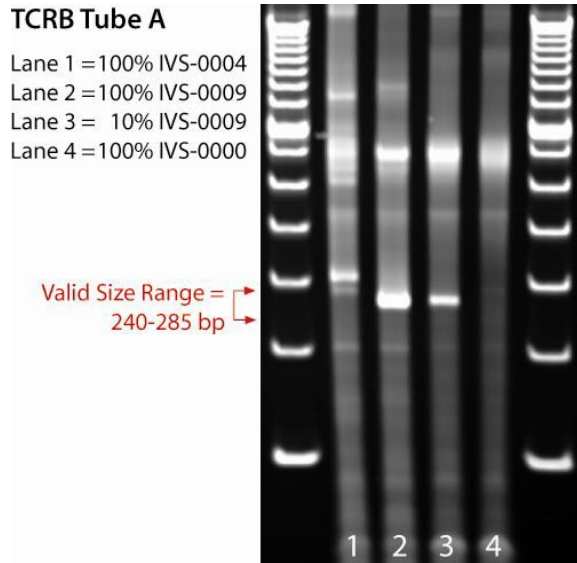


Figure 2. TCRB Tube A

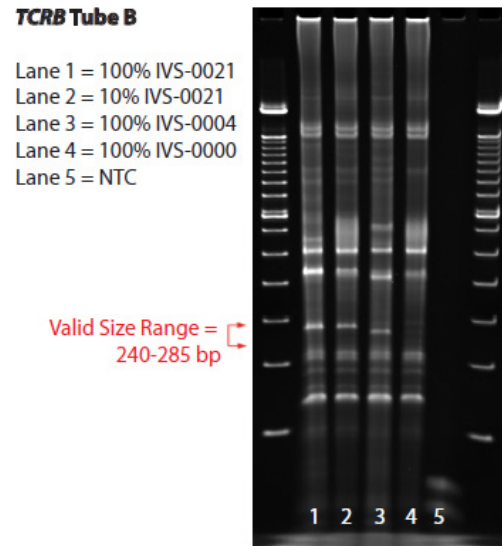


Figure 3. TCRB Tube B

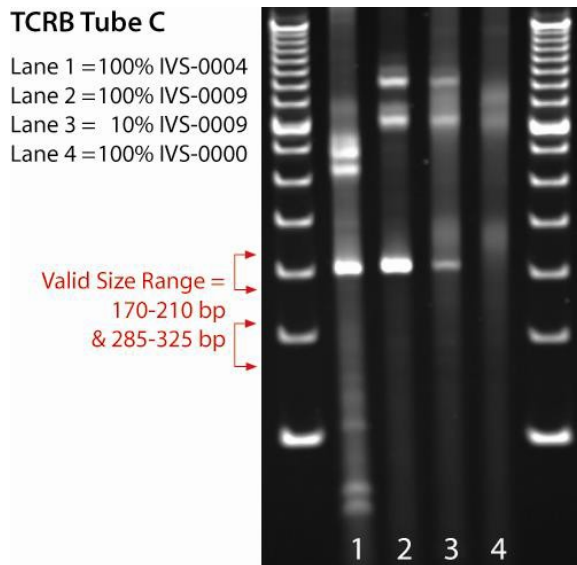


Figure 4. TCRB Tube C

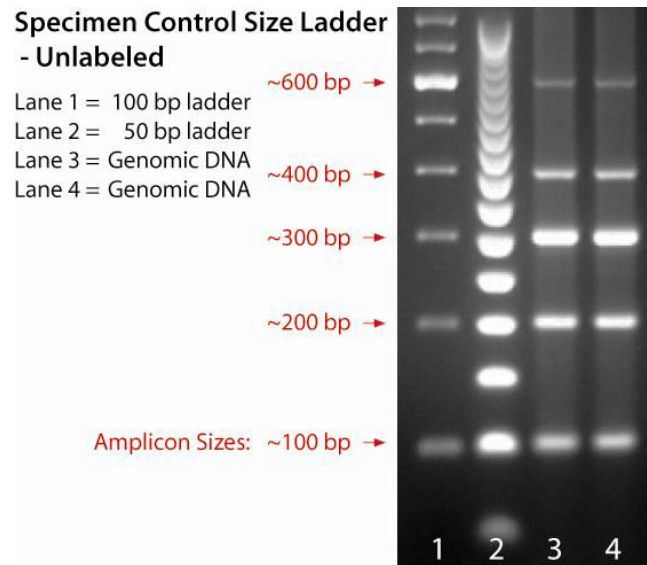


Figure 5. Specimen Control Size Ladder Master Mix.

- Les données montrées ci-dessous ont été produites avec le Master Mix indiqué. Les produits amplifiés ont migré dans un gel d'agarose à 2%.

11. Caractéristiques de Performance

Ce test PCR IdentiClone *TCRB* Gene Clonality est une procédure rapide et fiable qui est de loin plus sensible que l'analyse Southern Blot (SB) dans la détection de clonalité dans les lymphoproliférations suspectées. Le diagnostic clinico-histopathologique final est bien corrélé aux résultats PCR chez un nombre plus élevé de patients en comparaison avec les résultats de SB. Ceci est mis en évidence dans deux études de référence, l'une publiée en 2003 dans *Leukemia* par Van Dongen *et al.* et l'autre publiée en 2005 dans le *Journal of Molecular Diagnostics (JMD)* par Sandberg *et al.*

Tableau 9. Taille

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

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

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

L'analyse de Sandberg *et al.*, est une étude indépendante portant sur 300 échantillons de patients de types différents. Dans le cas où les deux analyses PCR et SB étaient réalisées et les résultats pouvaient être corrélés à l'histopathologie et au diagnostic final, la précision du diagnostique des tests IdentiClone sélectionnés fut déterminée comme étant d'au moins 96%. Ce qui était bien plus précis que l'analyse SB, qui dans cette étude passa à côté de 23 cas évidents de malignités et de 7 cas de malignités probables. Il n'y eut aucun résultat faux positif évident avec les tests IdentiClone et il y avait un niveau élevé de précision.³ De plus un bénéfice évident de cette analyse était que les résultats clonaux générés ont permis une détection avancée de réarrangements de gène patient-et tumeur-spécifiques pour la détection de maladie résiduelle minimale.

12. Service Technique et Client

Les Représentants des Services Techniques et Clients sont disponibles du lundi au vendredi pour répondre à vos questions par téléphone, e-mail, ou sur le site internet.

Coordonnées

Invivoscribe, Inc.
10222 Barnes Canyon Road, Bldg. 1
San Diego, California 92121-2711
USA

Téléphone: +1 858 224 6600
Fax: +1 858 224 6601
Service Technique: support@invivoscribe.com
Service Client: sales@invivoscribe.com
Site Internet: www.invivoscribe.com
Ouvert de: 7:00 à 17:00 PST/PDT

Mandataire et Assistance Technique CE

ECREP Invivoscribe, SARL
Le Forum – Bât B
515 Avenue de la Tramontane
ZI Athelia IV
13600 La Ciotat, France









Téléphone: +33 (0)4 42 01 78 10
Fax: +33 (0)4 88 56 22 89
Service Technique: support@invivoscribe.com
Service Client: sales-eu@invivoscribe.com
Site Internet: www.invivoscribe.com
Ouvert de: 7:00 à 17:00 CET/CEST

13. Références

1. Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. (1999). An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Molecular Diagnostics* 4, 101-117.
2. Van Dongen, JJM *et al.* (2003). 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*. 17, 2257-2317.
3. Sandberg, Y *et al.* (2005). BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern Blot analysis in routine clonality diagnostics. *J. Molecular Diagnostic* 7, 495-503.
4. van Krieken, JHJM *et al.* (2007). Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: – Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 21, 201-206.

14. Symboles Clés Utilisés

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

| | | | |
|---|---------------------------------------|---|--|
|  | Destiné au diagnostic <i>in vitro</i> |  | Date de péremption |
|  | Numéro de référence |  | Représentant agréé dans la Communauté européenne |
|  | Volume du réactif |  | Conditions de conservation |
|  | Numéro de lot |  | Consulter les instructions d'utilisation |

15. Informations Légales

15.1. Garantie et responsabilité

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) s'engage à fournir des produits de la plus haute qualité. Invivoscribe® garantit que les produits respectent ou dépassent les normes de performance décrites dans les Instructions. Si un produit est couvert par un produit, il s'agit d'une politique visant à remplacer le produit ou à créditer le prix d'achat total. Invivoscribe® ne fournit aucune autre garantie, explicite ou implicite, de quelque nature que ce soit. La responsabilité d'Invivoscribe® ne dépassera pas le prix d'achat du produit. Se renseigner sur les résultats d'une enquête produits dans des conditions contrôlées par l'acheteur dans le laboratoire de l'acheteur doivent être établis et surveillés en permanence par l'acheteur. La commande, l'acceptation et l'utilisation du produit constituent une responsabilité de la part de l'acheteur pour l'efficacité du produit et son acceptation de la limitation de la responsabilité.

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

15.2. Brevets et Marques

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

Identiclone® est une marque déposée d'Invivoscribe®

©2020 Invivoscribe, Inc. Tous droits réservés. Les marques commerciales mentionnées ici sont la propriété d'Invivoscribe, Inc. et / ou de ses filiales ou de leurs propriétaires respectifs.

15.3. Avis à l'acheteur - EagleTaq DNA Polymerase UNIQUEMENT

Ce produit est destiné à la vente aux fins de recherche dans l'Espace économique européen (EEE) uniquement. Il ne doit pas être revendu ou transféré à une autre partie. L'utilisation de ce produit est couverte par le brevet américain n° 6 127 155 et les revendications de brevet correspondantes hors des États-Unis. Cet acheteur de ce produit ne peut utiliser cette quantité de produit que pour ses propres recherches internes. Tous droits réservés par d'autres sociétés. Ce produit est réservé à la recherche. Les utilisations du diagnostic humain et vétérinaire selon les revendications du brevet de Roche nécessitent une licence distincte de Roche. Toutes les utilisations autres que la recherche interne et les utilisations pour la santé humaine et le diagnostic vétérinaire selon les revendications du brevet de Roche. En utilisant ce produit, vous reconnaissez votre accord avec ce qui précède. Pour plus d'informations sur l'octroi de licences Roche, contactez le service des licences de Roche Molecular Systems, Inc., 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, Californie 94588, États-Unis ou de Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim, Allemagne. Des informations complémentaires sur Thermo Fisher Scientific peuvent être obtenues en contactant le département des licences de Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, Californie 92008, États-Unis.