

Notice d'Utilisation

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*

 invivoscribe®

 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 92050011	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Réactions
REF 92050021	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence 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 par Fluorescence Différentielle.....	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.	Instruments d'Electrophorèse Capillaire ABI.....	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.	PROCEDURE D'ANALYSE.....	9
7.1.	Matériels Fournis	9
7.2.	Matériels Requis (non fourni).....	9
7.3.	Préparation du Réactif	10
7.4.	Amplification	11
7.5.	Détection par ABI Fluorescence	12
7.6.	Contrôle Qualité.....	13
7.7.	Contrôles Positifs Recommandés.....	13
8.	INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	13
8.1.	Analyse	13
8.2.	Interprétation de l'Echantillon	14
9.	LIMITES DE LA PROCÉDURE	14
10.	VALEURS ATTENDUES.....	15
10.1.	Taille Attendue des Produits Amplifiés	15
10.2.	Données de l'échantillon	15
11.	CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	17
12.	SERVICE TECHNIQUE ET CLIENT	17
13.	RÉFÉRENCES	17
14.	SYMBOLES.....	18
15.	INFORMATIONS LÉGALES.....	18
15.1.	Garantie et responsabilité	18
15.2.	Brevets et Marques.....	18

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 détection ABI ne peuvent détecter de manière fiable les populations clonales représentant moins de 1% 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 96, 197, 297, 397 et 602 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* Tubes 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.



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.

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



Puisque les gènes des récepteurs à 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 par Fluorescence Différentielle

La détection par fluorescence différentielle est communément utilisée pour séparer les produits d'amplification de différente taille avec un instrument à électrophorèse capillaire. Les amorces peuvent être conjuguées avec plusieurs marqueurs fluorescents (fluorophores) qui peuvent produire différents spectres d'émission sous l'excitation d'un laser d'instrument à électrophorèse capillaire. De cette façon, différents marqueurs fluorescents peuvent correspondre à différentes régions ciblées. De cette méthode de détection résulte une sensibilité inégalée, une résolution au nucléotide près, une détection différentielle du produit, et une quantification relative. De plus, l'emploi d'agarose et de gels de polyacrylamide, ainsi que l'emploi de cancérigènes tels que le bromure d'éthidium, peuvent pratiquement être éliminés. Enfin, la détection différentielle permet une interprétation précise, reproductible et objective des produits spécifiques des amorces et l'archivage automatique des données. La reproductibilité inter-test et intra-test dans la détermination de la taille par électrophorèse capillaire est d'approximativement 1 à 2 nucléotides. Ces reproductibilité et sensibilité couplées à l'archivage automatique des données du prélèvement permettent le suivi, la traçabilité et la comparaison des données du patient dans le temps.

4. Réactifs

4.1. Composition des Réactifs

Tableau 1. Kits l'avail



Catalogue N°	Produits	Quantité
 92050011	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reactions
 92050021	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reactions

Tableau 2. Composition des Réactifs

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

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

4.2. Avertissements et Précautions

- **IVD** Ce produit est 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. Instruments d'Électrophorèse Capillaire ABI

- Utilisation ou Fonction: Détection et Analyse de fragment
- Caractéristiques de Performance et Spécification:
 - Les instruments d'électrophorèse capillaire suivants peuvent être utilisés pour cette analyse:
 - ABI 310 Genetic Analyzer (1-capillaire)
 - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4-capillaires)
 - ABI 3100 Genetic Analyzer (16-capillaires)
 - ABI 3130 Genetic Analyzer (4-capillaires)
 - ABI 3130xL Genetic Analyzer (16-capillaires)
 - ABI 3500 Genetic Analyzer (8-capillaires)
 - ABI 3500xL Genetic Analyzer (24-capillaires)
- Suivre les procédures d'installation, d'opération, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.
- L'instrument ABI doit être étalonné avec les jeux de fluorophores "Dye Sets" 6FAM, HEX, NED et ROX.
- Utiliser les paramètres par défaut pour votre type de polymère et de capillaire.
- Voir section 7.5 *Détection par ABI Fluorescence* pour la préparation des échantillons.

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 à 8°C ou entre -85°C à -65°C jusqu'à utilisation.

7. Procédure d'Analyse

7.1. Matériels Fournis

Tableau 3. Matériels Fournis

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

7.2. Matériels Requis (non fourni)

Tableau 4. Matériels Requis (non-fournis)

Réactif/Matériel	Réactifs Recommandés /Matériels et Fournisseurs	N° de référence	Notes
ADN Polymérase	Roche: <ul style="list-style-type: none"> EagleTaq DNA Polymerase Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> FalconTaq DNA Polymerase ou équivalent 	05206944190 60970130	S.O.
Eau Distillée Déionisée de Biologie Moléculaire ou Stérile USP	S.O.	S.O.	DNase / RNase exempts
Pipettes Calibrées	Rainin: <ul style="list-style-type: none"> Pipettes P-2, P-20, P-200, et P-1000 Ou pipettes SL-2, SL-20, SL-200, et SL-1000 	S.O.	Doit être capable de mesurer précisément des volumes allant de 1µl à 1 000µl.
Thermocycleur	Bio-Rad: <ul style="list-style-type: none"> MJ Research PTC-100 ou PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer <ul style="list-style-type: none"> PE 9600 ou PE 9700 	S.O.	S.O.
Vortex	S.O.	S.O.	S.O.
Plaques ou tubes PCR	S.O.	S.O.	Stériles
Cônes de pipette à filtre	S.O.	S.O.	Stériles, exempts de RNase/DNase/Pyrogène
 Tubes Microcentrifuges	S.O.	S.O.	Stériles
Instrument ABI Electrophorèse Capillaire	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> ABI séries 310, 3100, 3130 , ou 3500. 	S.O.	S.O.
Formamide Hi-Di	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Hi-Di™ Formamide 	4311320	S.O.
Marqueur de Taille	Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> Hi-Di Formamide w/ROX size standards for ABI 3100 Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Pour les instruments ABI 3100 ou 3130: <ul style="list-style-type: none"> GeneScan® - 400HD [ROX]™ Pour les instruments ABI 3500: <ul style="list-style-type: none"> GeneScan® - 600 [LIZ]™ v2.0 	60980061 402985 4408399	S.O.
Tampon	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> 10X Genetic Analyzer Buffer avec EDTA 	402824	Diluer au 1/10 ^{ème} dans de l'eau stérile avant utilisation

Tableau 4. Matériels Requis (non-fournis)

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

7.3. Préparation 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

$$n = 2 \times \text{Nbre d'échantillon} + 4 \quad \text{Total}$$

- 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 positif (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	Témoin négatif PCR sans ADN (eau)
+ 1	pour corriger l’erreur de pipetage

$$m = \text{Nbre d'échantillon} + 3 \quad \text{Total}$$

- 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 0,25 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 × 0,25 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 5 µL 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.

Guide pratique

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

n X 45 µL de mélange mère (Master Mix)

n X 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 Taq pour *TCRB* Tubes A et B et **0,25 µL** du 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 par ABI Fluorescence

Veillez noter que pour la détection par ABI fluorescence un pic précurseur est souvent visible. C'est un artefact dû à la méthode de détection employée par les plateformes ABI. Les pics précurseurs sont parfois incurvés et ont des bases dont le côté droit penche vers le pic réel. C'est particulièrement évident pour le Specimen Control Size Ladder Master Mix où le pic des 96 nucléotides a un pic précurseur qui sort à 84 nucléotides.

- Nous ne recommandons pas le multiplexage des produits de PCR de différents Master Mixes qui résulterait en une sensibilité globale réduite de l'analyse.

Plates-formes ABI 310, 3100, ou 3130

- 7.5.1. Dans un tube Microcentrifuge neuf, mélanger une quantité appropriée (pour un total de 10 µL par réaction PCR) de Formamide Hi-Di avec les Marqueurs^a de taille ROX. Bien vortexer.
- 7.5.2. Dans une plaque PCR 96-puits, ajouter 10 µL de Formamide Hi-Di avec les Marqueurs de taille ROX dans un puit individuel pour chaque réaction PCR.
- 7.5.3. Transférer 1 µL de chaque réaction PCR aux puits contenant le Formamide Hi-Di avec les Marqueurs de taille ROX.
 - Ajouter un seul échantillon par puit.
 - Aspirer et refouler 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'électrophorèses capillaire ABI en suivant le manuel d'utilisation.
- 7.5.8. Les données sont automatiquement affichées comme pics de taille et de couleur spécifiques. Revoir le profile et les contrôles, reporter les résultats. (voir sections 8 *Interprétation des Résultats* et 10 *Valeurs Attendues*)

Plates-formes ABI 3500:

Remarque: En raison d'écarts de performance entre les instruments ABI 3500, la quantité de formamide, échantillon et marqueurs de taille standard (Size Standards) énumérés dans le protocole ci-dessous est destinée à être un point de départ. Le protocole peut nécessiter une optimisation spécifique à chaque instrument ABI 3500.

- 7.5.9. Dans un tube Microcentrifuge neuf, mélanger une quantité appropriée (9,5 µL par réaction PCR) de Formamide Hi-Di avec les Marqueurs de taille LIZ Size Standards.^a Bien Vortexer.
- 7.5.10. Dans une nouvelle plaque pour PCR à 96 puits, ajouter 9,5 µL de Formamide Hi-Di avec les Marqueurs de taille LIZ Size Standards dans un puits individuel pour chaque réaction PCR.
- 7.5.11. Transférer 0,5 µL de chaque réaction PCR aux puits contenant le Formamide Hi-Di avec les Marqueurs de taille LIZ Size Standards.
 - Ajouter un seul échantillon par puits.
 - Aspirer et refouler 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 **d'échantillons** et une **liste d'injection** des échantillons.
- 7.5.15. Analyser les échantillons avec un instrument d'électrophorèse capillaire ABI 3500 en suivant le manuel d'utilisation.
- 7.5.16. Les données sont automatiquement affichées comme pics de taille et de couleur spécifiques. Revoir le profile et les contrôles et reporter les résultats. (voir sections 8 *Interprétation des Résultats* et 10 *Valeurs Attendues*)

^aRemarque : Veuillez consulter la notice de Applied Biosystems accompagnant les produits pour mélanger le Formamide Hi-Di avec les Marqueurs de taille standard pour les différents instruments ABI.

7.6. Contrôle Qualité

Les contrôles positifs et négatifs (ou normaux) sont fournis avec le kit et doivent être analysés une seule fois 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. Les tailles d'amplicons visibles sur votre instrument électrophorèse capillaire spécifique peuvent différer de 1 à 4 nucléotides (nt) de celles listées selon la plateforme de détection et la version du logiciel d'analyse utilisé. Une fois identifiée, la taille de l'amplicon déterminée sur votre plateforme spécifique sera cohérente d'un essai à l'autre. Cette reproductibilité est extrêmement utile pour suivre la récurrence de la maladie.

Remarque : "Couleur" indique la couleur des produits générée avec le Master Mix en utilisant le paramétrage de couleur par défaut sur les systèmes de détection par fluorescence ABI.

Tableau 6. Contrôles Positifs Recommandés

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

***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 602 pb. Pour la détection par fluorescence ABI le pic 602 pb peut ne pas apparaître pendant les temps normaux d'analyse.

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 10.1 <i>Taille Attendue des Produits Amplifiés</i> . Aucun réarrangement clonal n'est présent. Continuer l'analyse.	Des réarrangements clonaux sont présents. Refaire l'analyse.
Contrôle positif (Peut aussi être un contrôle d'extraction si le matériel du contrôle positif est prélevé par un procédé d'extraction)	La taille du produit est cohérente avec la taille attendue listée dans la section 10.1 <i>Taille Attendue des Produits Amplifiés</i> . Continuer l'analyse.	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 96, 197, 297, 397 et 602 pb sont visibles, continuer l'analyse. Parce que des fragments d'ADN plus petits sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare pour le fragment 602 pb 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:

- Un ou deux pic positif(s) proéminent(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 pic positif^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.”

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

- Les produits d'**échantillons de diagnostic** tombant dans la gamme de taille attendue et ayant une amplitude d'au moins trois fois celle du troisième plus gros pic du fond polyclonal sont cohérents avec un pic positif.
- Les produits d'**échantillons collectés après le diagnostic initial** tombant dans la gamme de taille attendue et ayant soit; 1) une amplitude d'au moins trois fois celle du troisième plus gros pic; soit, 2) une amplitude dépassant les pics voisins adjacents et identiques en taille aux produits clonaux d'amplicons obtenus précédemment du même patient avec l'emploi du même Master Mix, sont cohérents avec 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 de 1 cellule positive 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. Les tailles des amplicons visibles sur votre instrument spécifique à électrophorèse capillaire peuvent différer de 1 to 4 nucléotides (nt) de celles listées selon la plateforme de détection et la version du logiciel d'analyse utilisé. Une fois identifiée, la taille de l'amplicon déterminée sur votre plateforme spécifique sera cohérente d'un essai à l'autre. Cette reproductibilité est extrêmement utile pour enregistrer la récurrence de maladie.

Rémarque : "Couleur" indique la couleur des produits générée avec le Master Mix en utilisant le paramétrage de couleur par défaut sur les systèmes de détection par fluorescence ABI.

Tableau 6. Taille Attendue des Produits Amplifiés

Mélange mère	Cible	Couleur	ADN Contrôle	N° de référence	Taille du Produit (pb) ^b
TCRB Tube A	Vβ + Jβ1/2	Bleu (Jβ2,X) + Vert (Jβ1,X)	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	Bleu (Jβ2,X)	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
			IVS-0021 Clonal Control DNA	40881210	267
TCRB Tube C	Dβ + Jβ1/2	Bleu (Jβ2,X) + Vert (Jβ1,X)	Taille Attendue	---	170-210 (Dβ2), 285-325 (Dβ1)
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	128 ^b , 170-210, 285-325, 337 ^b
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	309
			IVS-0004 Clonal Control DNA	40880190	295
Specimen Control Size	Gènes Multiples	Bleu	Taille Attendue	---	96, 197, 297, 397, 602^c
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	96, 197, 297, 397, 602 ^c

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

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

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

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

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

^fRémarque: dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'obtenir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 602 pb.

10.2. Données de l'échantillon

Les données montrées ci-dessous ont été produites avec les Master Mixes indiqués. Les produits amplifiés ont été analysés sur un instrument ABI. ("Valid Size Range" = Taille Attendue).

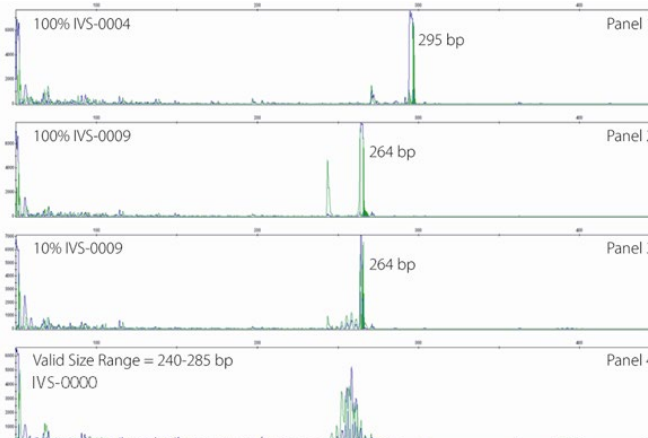


Figure 2. TCRB Tube A - 6FAM & HEX

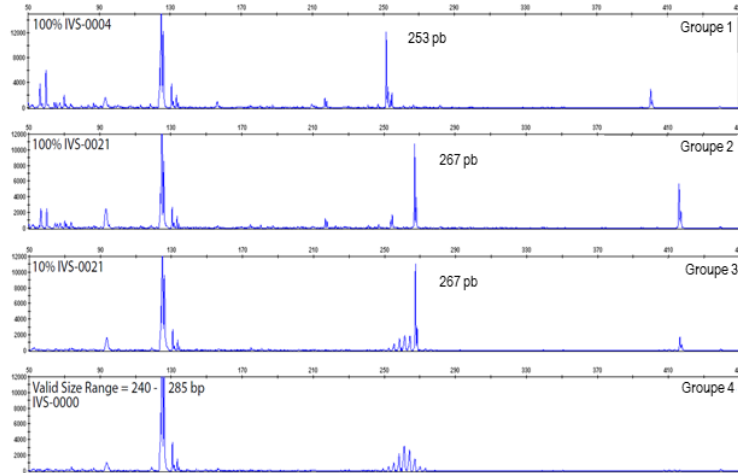


Figure 3. TCRB Tube B - 6FAM

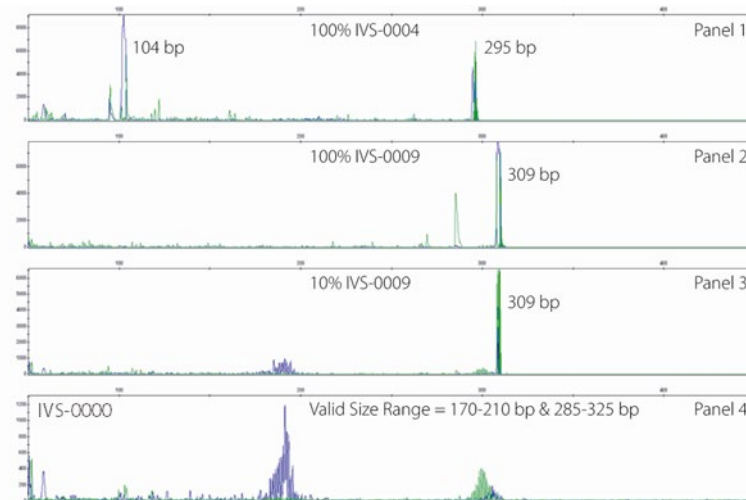


Figure 4. TCRB Tube C - 6FAM & HEX

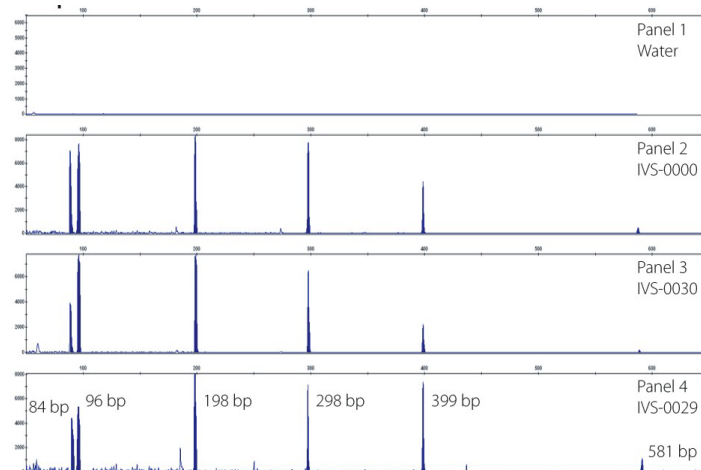


Figure 5. Le Specimen Control Size Ladder – 6FAM

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 Moléculaire Diagnostics (JMD)* par Sandberg *et al.*

Tableau 8. 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 9. 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 diagnostic 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 eu 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 | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | États-Unis

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

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

13. 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

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

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

15. Informations Légales

15.1. Garantie et responsabilité

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

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

15.2. Brevets et Marques

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

Identiclone® est une marque déposée d'Invivoscribe®

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