

Mode d'emploi

CE IVD

IdentiClone® IGH + IGK B-Cell Clonality Assay

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

IVD Destiné au diagnostic *in vitro*.



 invivoscribe®

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

N° de référence

Produits

Quantité

REF 9100010

IdentiClone IGH + IGK B-Cell Clonality Assay – Gel Detection

33 réactions

Table des matières

1.	UTILISATION PREVUE	3
2.	RESUME ET EXPLICATION DU TEST	3
2.1.	Contexte	3
2.2.	Résumé	3
3.	PRINCIPES DE LA PROCEDURE	4
3.1.	Amplification en chaîne par polymérase (PCR)	4
3.2.	Détection sur gel	4
4.	REACTIFS	5
4.1.	Composants	5
4.1.	Avertissements et précautions	6
4.2.	Conservation et manipulation	6
5.	INSTRUMENTS	7
5.1.	Thermal cycler	7
5.2.	Unité d'électrophorèse	7
5.3.	Unité à radiation UV	7
6.	PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	8
6.1.	Précautions	8
6.2.	Substances interférentes	8
6.3.	Conditions de prélèvement et manipulation	8
6.4.	Préparation de l'échantillon	8
6.5.	Conservation des échantillons	8
7.	PROCEDURE DE TEST	9
7.1.	Matériel fourni	9
7.2.	Matériel nécessaire (mais non fourni)	9
7.3.	Préparation des réactifs	10
7.4.	Amplification	11
7.5.	Détection sur gel – analyse d'hétéroduplex	11
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'échantillon	13
9.	LIMITES DE LA PROCEDURE	14
10.	VALEURS ATTENDUES	14
10.1.	Taille attendue des produits amplifiés	14
10.2.	Données de l'échantillon	15
11.	CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE	16
12.	BIBLIOGRAPHIE	16
13.	SUPPORT TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT	17
14.	SYMBOLES	17
15.	INFORMATIONS LEGALES	18
15.1.	Garantie et responsabilité	18
15.2.	Brevets et marques commerciales	18
15.3.	Avis à l'acheteur – EagleTaq DNA Polymerase (ADN polymérase EagleTaq) UNIQUEMENT	18

1. Utilisation prévue

Le test IdentiClone *IGH + IGK* B-Cell Clonality Assay est un produit de diagnostic *in vitro* destiné à la détection des réarrangements clonaux du gène de chaîne lourde et de chaîne légère kappa d'immunoglobuline par amplification en chaîne par polymérase (PCR) chez les patients chez qui l'on suspecte un syndrome lymphoprolifératif. Le test *IGH + IGK* B-Cell Clonality Assay peut notamment être utilisé pour :

- Identifier la clonalité dans le cas de syndromes lymphoprolifératifs atypiques
- Étayer un diagnostic différentiel entre lésions réactives et hémopathies malignes⁴
- Déterminer la lignée présumée dans le cas de syndromes lymphoprolifératifs monoclonaux matures
- Identifier des marqueurs tumoraux spécifiques (réarrangements des gènes *IGH* et *IGK*) pour la surveillance après traitement
- Surveiller et évaluer la récurrence de la maladie

2. Résumé et explication du test

2.1. Contexte

Les réarrangements des gènes des récepteurs d'antigènes ont lieu au cours de l'ontogenèse des lymphocytes B et T. Ces réarrangements de gènes génèrent des produits dont la longueur et la séquence sont uniques pour chaque cellule. Par conséquent, les analyses par amplification en chaîne par polymérase (PCR) peuvent être utilisées pour identifier les populations de lymphocytes issues d'une seule cellule en détectant les réarrangements des gènes V-J uniques présents dans ces loci des récepteurs aux antigènes.¹ Cette analyse par PCR IdentiClone utilise différentes amorces d'ADN consensus ciblant les régions génétiques conservées au sein du gène de chaîne lourde et de chaîne légère kappa d'immunoglobuline. Ce test permet de détecter la majeure partie des tumeurs malignes à lymphocytes B clonaux à partir de l'ADN. Les produits des tests peuvent être analysés en utilisant divers formats de détection, notamment l'électrophorèse sur gel et l'électrophorèse capillaire.

Les tests IdentiClone d'Invivoscribe représentent une nouvelle approche en matière d'analyse de la clonalité par PCR. Ces tests standardisés ont été soigneusement optimisés en analysant des échantillons de contrôles positifs et négatifs à l'aide de mélanges mères de PCR multiplexe. Le développement des tests a été suivi d'une validation importante comprenant l'analyse de plus de 400 échantillons cliniques à l'aide de la classification REAL (Revised European/American Lymphoma). Les tests ont été réalisés dans plus de 30 centres d'analyse majeurs indépendants dans toute l'Europe dans le cadre d'une étude collaborative connue sous le nom de BIOMED-2 Concerted Action (Action Concertée BIOMED-2). Les résultats de cette étude BIOMED-2 indiquent que les réarrangements des gènes *IGH* et *IGK* pourraient améliorer la fiabilité et la sensibilité des tests.² En outre, l'analyse conjointe des réarrangements des gènes *IGH* et *IGK* a conduit à une sensibilité de 99 %, par rapport à 88 % pour *IGH* et 88 % pour *IGK* analysés seuls. Ce qui pourrait également améliorer la fiabilité des analyses dans la mesure où il est plus probable que les produits clonaux soient détectés dans plusieurs tubes.⁴

Les tests basés sur une détection sur gel ne peuvent détecter de manière fiable les populations clonales représentant moins de 5 % de la population totale de lymphocytes. Toujours interpréter les résultats des tests de clonalité moléculaire dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.

2.2. Résumé

Ce kit d'analyse contient 6 mélanges mères (master mixes). The *IGH* Tube A, B, and C master mixes target the framework 1 Ce kit d'analyse contient 6 mélanges mères. Les mélanges mères *IGH* Tubes A, B et C ciblent les régions de la structure ou « framework » 1, 2 et 3 (respectivement) au sein des régions variable et de jonction du locus de la chaîne lourde d'immunoglobuline. Le mélange mère *IGK* Tube A cible les régions variable (V) et de jonction (J) du locus de la chaîne légère kappa d'immunoglobuline. En revanche, le mélange mère *IGK* Tube B cible les réarrangements de séquence dite K_{de} « kappa deleting element » avec la région variable (V) et la région intragénique $J\kappa-C\kappa$. Les réarrangements $V\kappa-K_{de}$ et $J\kappa-C\kappa$ intron- K_{de} obtenus résultent de réarrangements infructueux conservés par le lymphocyte B. Enfin, le mélange mère Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle des échantillons) cible plusieurs gènes et génère une série de produits d'amplification d'environ 100, 200, 300, 400, et 600 nucléotides (nt) afin de garantir que la qualité et la quantité d'ADN introduit soient suffisantes à l'obtention d'un résultat fiable. Un seul programme de thermocycleur et des méthodologies de détection similaires sont utilisés pour tous nos tests de clonalité génique. Cela améliore la cohérence et facilite l'apprentissage croisé d'une large gamme de tests différents.

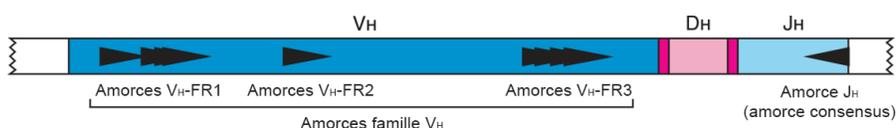
Ce test est basé sur EuroClonality/BIOMED-2 Concerted Action (Action Concertée EuroClonality/BIOMED-2) BMH4-CT98-3936.



3. Principes de la procédure

3.1. Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

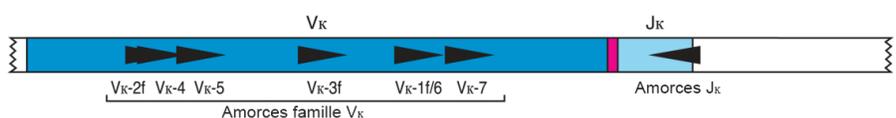
Les analyses PCR sont utilisées en routine pour l'identification de populations clonales de lymphocytes B. Ces tests amplifient l'ADN entre les amorces qui ciblent la structure ou « framework » (FR) conservée et les régions de jonction (J) (*IGH* Tubes A-C), les régions variable (V) et de jonction (J) (*IGK* Tube A) et les régions variable, J_K-C_K intron et K_{de} (*IGK* Tube B). Ces régions conservées se trouvent de part et d'autre d'une zone de la région V-J où ont lieu des réarrangements génétiques programmés au cours de la maturation de tous les lymphocytes B et T. Les gènes du récepteur antigénique qui subissent un réarrangement sont ceux des chaînes lourdes et des chaînes légères de l'immunoglobuline des lymphocytes B, ainsi que les gènes des récepteurs des lymphocytes T. Chaque lymphocyte B et T possède un seul réarrangement V-J fonctionnel dont la longueur et la séquence sont uniques. Ainsi, quand l'ADN d'une population normale ou polyclonale est amplifié avec des amorces ADN qui encadrent la région V-J, une courbe en cloche (distribution gaussienne) des produits d'amplification dans la plage de taille attendue est générée, reflétant la population hétérogène des réarrangements V-J. L'ADN provenant d'échantillons contenant une population clonale génère un ou deux produits d'amplification (amplicons) majeurs sur un fond polyclonal réduit.



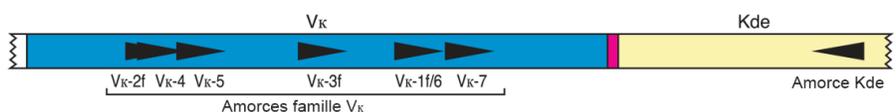
IGH Tube A: 6 amorces VH-FR1 + amorce consensus JH

IGH Tube B: 7 amorces VH-FR2 + amorce consensus JH

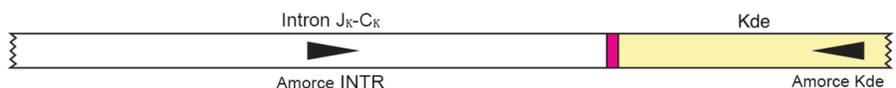
IGH Tube C: 7 amorces VH-FR3 + amorce consensus JH



IGK Tube A: 6 amorces V_K - 2 amorces J_K



IGK Tube B: 6 amorces V_K et amorce INTR + 1 amorce



Les gènes des récepteurs antigéniques étant polymorphiques (composés d'une population hétérogène de séquences ADN apparentées), il est difficile d'utiliser un seul jeu de séquences ADN amorces pour cibler toutes les régions flanquantes conservées autour du réarrangement V-J. La diversité de la région N et les mutations somatiques modifient encore plus les séquences d'ADN de ces régions. Ainsi, les mélanges mères de multiplexes ciblant plusieurs régions FR sont nécessaires à l'identification de la majorité des réarrangements clonaux. Comme indiqué, les réarrangements clonaux sont identifiés sous la forme d'un ou de deux produits majeurs de taille unique sur le fond de produits d'amplification de diverses tailles qui forment une distribution gaussienne autour d'un réarrangement statistiquement majoritaire. Les amorces amplifiant les différentes régions FR, qui sont situées sur trois sections distinctes le long du gène de la chaîne lourde, produisent une plage de taille correspondante différente des produits V-J. Pour les réarrangements du gène *IGK*, la longueur de la région CDR3 est limitée et montre une déviation significative (distribution platykurtique). Les produits PCR présentent ainsi une distribution gaussienne très réduite, et il est plus facile et fiable de les identifier par analyse d'hétéroduplex.

3.2. Détection sur gel

Le gel d'électrophorèse, tel que le gel d'agarose ou le gel d'électrophorèse non dénaturant de polyacrylamide (PAGE), est couramment employé pour séparer les différents produits d'amplification selon leur taille, leur charge et leur conformation. L'ADN étant chargé négativement, lorsqu'un potentiel électrique (tension) est appliqué au gel contenant les produits PCR, le champ électrique entraîne la migration des amplicons à travers le gel. Les fragments d'ADN les plus petits peuvent migrer facilement dans la matrice du gel, alors que les fragments d'ADN les plus grands migrent plus lentement. Cela entraîne la séparation des produits d'amplification en fonction de leur taille. Le bromure d'éthidium ou d'autres colorants intercalant de l'ADN peuvent alors être utilisés pour colorer et détecter ces produits dans le gel.

Figure 1. Représentation simplifiée de l'organisation d'un gène réarrangé de chaîne lourde d'immunoglobuline (*IGH*) sur le chromosome 14 et d'un gène réarrangé de chaîne légère kappa d'immunoglobuline sur le chromosome 2p11.2. Les flèches noires représentent les positions relatives des amorces qui ciblent la structure (FR1-3) conservée et les segments de gène J_H consensus en aval pour *IGH*, ainsi que les amorces V_K, J_K, INTR et K_{de} contenues dans les tubes de mélange mère *IGK*. Les produits d'amplification générés par chacune de ces régions peuvent être détectés de manière différentielle lorsque des jeux d'amorces fluorescentes sont utilisés avec des instruments d'électrophorèse capillaire ayant recours à la détection par fluorescence différentielle.

Une analyse d'hétéroduplex peut aussi être réalisée sur gel de polyacrylamide pour différencier les produits PCR clonaux des non-clonaux. L'analyse d'hétéroduplex correspond à une dénaturation des produits PCR à température élevée, puis à une réhybridation rapide des brins d'ADN par une réduction soudaine de la température. Cela entraîne un appariement incorrect d'une grande partie des brins d'ADN à d'autres brins non homologues créant des boucles dans l'ADN. Ces boucles réduisent de manière significative la capacité de l'ADN à migrer à travers le gel de polyacrylamide. Cependant, si la majorité des produits PCR sont clonaux, lors d'une analyse d'hétéroduplex, la plupart des produits PCR se réhybrident correctement avec des brins homologues. Ces produits PCR passent normalement dans le gel de polyacrylamide. Ainsi, dans un échantillon clonal avec un fond polyclonal, une analyse d'hétéroduplex montre que la plupart des produits polyclonaux avancent beaucoup plus lentement dans le gel de polyacrylamide, ce qui augmente leur séparation et la capacité à identifier la ou les bandes clonales.

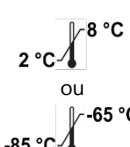
4. Réactifs

4.1. Composants

Tableau 1 : Tests disponibles

Numéro de référence	Description	Quantité
REF 91000010	IdentiClone <i>IGH</i> + <i>IGK</i> B-Cell Clonality Assay – Gel Detection	33 réactions

Tableau 2. Composants du kit

Réactif	N° de référence	Composants des réactifs (substances actives)	Quantité unitaire	Nbre d'unités	Temp. de conservation
Mélanges mères	21010010CE	<i>IGH</i> Tube A – Unlabeled Oligonucléotides multiples ciblant la région structurelle 1 du gène de chaîne lourde d'immunoglobuline en solution saline tamponnée.	1 500 µL	1	
	21010020CE	<i>IGH</i> Tube B – Unlabeled Oligonucléotides multiples ciblant la région structurelle 2 du gène de chaîne lourde d'immunoglobuline en solution saline tamponnée.	1 500 µL	1	
	21010030CE	<i>IGH</i> Tube C – Unlabeled Oligonucléotides multiples ciblant la région structurelle 3 du gène de chaîne lourde d'immunoglobuline en solution saline tamponnée.	1 500 µL	1	
	21020010CE	<i>IGK</i> Tube A – Unlabeled Oligonucléotides multiples ciblant les régions variable et de jonction du gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline en solution saline tamponnée.	1 500 µL	1	
	21020020CE	<i>IGK</i> Tube B – Unlabeled Oligonucléotides multiples ciblant les régions variable, Jκ-Cκ intron et K _{de} du gène de chaîne légère kappa d'immunoglobuline en solution saline tamponnée.	1 500 µL	1	
Mélange mère témoin d'amplification	20960020	Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (Marqueur de taille contrôle des échantillons) Différents oligonucléotides ciblant des gènes de ménage.	1 500 µL	1	
ADN de contrôle positif	40881750	IVS-0030 Clonal Control DNA (ADN de contrôle clonal) 200 µg/mL d'ADN dans une solution TE au 1/10 ^e	100 µL	1	
	40881090	IVS-0019 Clonal Control DNA (ADN contrôle clonal) 200 µg/mL d'ADN dans une solution TE à 1/10 ^e	100 µL	1	
	40880370	IVS-0007 Clonal Control DNA (ADN contrôle clonal) 200 µg/mL d'ADN dans une solution TE au 1/10 ^e	100 µl	1	
ADN de contrôle négatif (normal)	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de contrôle polyclonal) 200 µg/mL d'ADN dans une solution TE au 1/10 ^e	100 µl	1	

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

4.1. Avertissements et précautions

- **IVD** Ce produit est destiné au diagnostic *in vitro*.
- Ce kit de test forme un système qui doit être utilisé tel quel. Ne pas remplacer les réactifs par ceux d'un autre fabricant. Une dilution, une réduction des volumes des réactions d'amplification ou tout autre écart par rapport à ce protocole peut affecter la performance de ce test et/ou annuler toute sous-licence limitée accordée avec l'achat de ce kit.
- Les produits sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.
- Le strict respect du protocole garantit une performance ainsi qu'une reproductibilité optimales. Veiller à utiliser le programme du thermocycleur adéquat, les autres programmes pouvant donner des résultats erronés/faussés, comme des faux positifs et des faux négatifs.
- Ne pas mélanger ou combiner les réactifs de kits comportant des numéros de lots différents.
- Porter un équipement de protection individuelle (EPI) approprié et suivre les bonnes pratiques de laboratoire ainsi que les précautions universelles lors de la manipulation des échantillons. Manipuler les échantillons dans des installations de confinement de sécurité biologique approuvées et ouvrir les récipients uniquement dans une enceinte de sécurité biologique certifiée. Utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire pour préparer l'ADN des échantillons.
- En raison de la sensibilité analytique de ce test, prendre de très grandes précautions pour éviter de contaminer les réactifs ou les mélanges d'amplification avec des échantillons, des contrôles ou des produits d'amplification. Contrôler attentivement tous les réactifs pour détecter tout signe de contamination (p. ex. contrôles négatifs donnant des signaux positifs). Jeter les réactifs suspectés d'être contaminés.
- Afin de réduire le risque de contamination, porter des gants propres lors de la manipulation des échantillons et des réactifs et nettoyer systématiquement les plans de travail et les pipettes avant de réaliser une PCR.
- L'autoclavage ne permet pas d'éliminer l'ADN issu d'une contamination. La progression du travail doit se faire dans un seul sens dans le laboratoire de PCR ; commencer par la préparation des mélanges mères, suivie de la préparation des échantillons, puis réaliser l'amplification et terminer par la détection. N'introduire aucun ADN amplifié dans les zones réservées à la préparation des mélanges mères ou des échantillons.
- Réserver toutes les pipettes et les pointes de pipette ainsi que tout le matériel utilisé dans une zone particulière à cette zone du laboratoire.
- Utiliser des consommables en plastique stériles et jetables dans la mesure du possible pour éviter toute contamination par des RNases, DNases ou une contamination croisée.

4.2. Conservation et manipulation

- Si les kits de test ne sont pas utilisés immédiatement, **ils doivent être conservés entre -85°C et -65°C**.
- La température de conservation optimale des ADN de contrôle est comprise entre 2°C et 8°C, et ils peuvent également être conservés à long terme entre -85°C et -65°C.
- Tous les réactifs et les contrôles doivent être décongelés et vortexés ou mélangés soigneusement avant utilisation pour assurer qu'ils soient bien remis en suspension. Un vortexage excessif peut endommager l'ADN et faire perdre leurs fluorophores aux amorces marquées.
- Les produits sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.
- En raison des concentrations élevées en sels, les mélanges mères de PCR sont sensibles aux cycles de congélation/décongélation. Si nécessaire, aliquoter les mélanges mères dans des tubes à bouchon à visser avec joint torique stériles.

5. Instruments

5.1. Thermal cycler

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

5.2. Unité d'électrophorèse

- Utilisation ou fonction: DNA fragment separation
- Caractéristiques de performance et spécifications :
 - Capable de fonctionner à 35 V et 135 V pendant des durées prolongées
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.

5.3. Unité à radiation UV

- Utilisation ou fonction : détection de l'ADN
- Caractéristiques de performance et spécifications :
 - Capable d'émettre une radiation à une longueur d'onde de ~302 nm
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.

6. Prélèvement et préparation des échantillons

6.1. Précautions

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

6.2. Substances interférentes

Les substances suivantes peuvent interférer avec la PCR :

- Chélateurs de cations divalents
- Pointes de pipette à faible rétention
- EDTA (non significatif à faible concentration)
- Héparine

6.3. Conditions de prélèvement et manipulation

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

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

6.4. Préparation de l'échantillon

Extraire l'ADN génomique des échantillons de patients dès que possible. Remettre l'ADN en suspension à une concentration finale comprise entre 100 µg et 400 µg par mL dans de la solution Tris-EDTA (Tris-HCl à 1 mM, pH 8,0 ; EDTA à 0,1 mM) au 1/10^e ou dans de l'eau de qualité biologie moléculaire ou de l'eau purifiée USP. Il s'agit d'un système de test robuste. Une large gamme de concentrations d'ADN générera un résultat valide. Par conséquent, il n'est pas nécessaire en général de quantifier et d'ajuster les concentrations d'ADN. Tester l'ADN des échantillons avec le mélange mère du marqueur de taille Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle des échantillons) assurera qu'un ADN de qualité et en quantité suffisantes était présent pour produire un résultat valide.

6.5. Conservation des échantillons

Conserver l'ADN génomique entre 2°C et 8°C ou entre -85°C et -65°C jusqu'à utilisation.

7. Procédure de test

7.1. Matériel fourni

Tableau 3. Composition du kit

N° de référence	Description
21010010CE	<i>IGH</i> Tube A – Unlabeled
21010020CE	<i>IGH</i> Tube B – Unlabeled
21010030CE	<i>IGH</i> Tube C – Unlabeled
21020010CE	<i>IGK</i> Tube A – Unlabeled
21020020CE	<i>IGK</i> Tube B – Unlabeled
20960020	Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle des échantillons) – Unlabeled
40881750	IVS-0030 Clonal Control DNA (ADN contrôle clonal)
40881090	IVS-0019 Clonal Control DNA (ADN contrôle clonal)
40880370	IVS-0007 Clonal Control DNA (ADN contrôle clonal)
40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de contrôle polyclonal)

7.2. Matériel nécessaire (mais non fourni)

Tableau 4. Matériel nécessaire (mais non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs/Matériel recommandés et fournisseurs	N° de référence	Remarques
ADN polymérase	Roche : <ul style="list-style-type: none"> ADN polymérase EagleTaq Invivoscribe, Inc. : <ul style="list-style-type: none"> ADN polymérase EagleTaq¹ ou équivalent 	05206944190 60970100	S.O.
Eau désionisée distillée dans du verre de qualité biologie moléculaire ou eau purifiée (USP)	S.O.	S.O.	Stérile et exempte de DNase et de RNase
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.	Précision requise pour mesurer des volumes allant de 1 µL à 1 000 µL
Thermocycleur	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Thermocycleur Verity Dx Bio-Rad : <ul style="list-style-type: none"> 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.
Agitateur vortex	S.O.	S.O.	S.O.
Plaques ou tubes pour PCR	S.O.	S.O.	Stériles
Pointes de pipette à filtre	S.O.	S.O.	Stériles, exemptes de RNase/DNase/apyrogènes
Microtubes à centrifuger	S.O.	S.O.	Stériles
Unité d'électrophorèse sur gel	S.O.	S.O.	Pour gels de polyacrylamide
Bromure d'éthidium	Invitrogen : <ul style="list-style-type: none"> UltraPure™ 10 mg/mL Ethidium Bromide 	15585-011	S.O.
Gels de polyacrylamide à 6 %	Invitrogen : <ul style="list-style-type: none"> Novex™ TBE Gels (6%, 12 well) 	EC62652Box	S.O.

¹Remarque : Ce produit est approuvé pour la vente et l'utilisation dans l'Espace économique européen uniquement. Il est interdit de revendre ce produit ou de le transférer à un tiers. Consulter également les informations légales à la section 15.

7.3. Préparation des réactifs

- Tous les échantillons inconnus peuvent être analysés avec le mélange mère Specimen Control Size Ladder afin de garantir que les échantillons d'ADN ne contiennent pas d'inhibiteur d'amplification et qu'ils sont de qualité adéquate et en quantité suffisante pour générer des résultats fiables.
- Un seul résultat par échantillon est acceptable ; toutefois, il est recommandé de tester chaque échantillon **en double** dans la mesure du possible. Si les tests en double donnent des résultats discordants, l'échantillon doit être retesté ou réévalué.
- Analyser les contrôles **positifs, négatifs et sans ADN** pour chaque mélange mère.
- Regrouper plusieurs échantillons par analyse afin d'éviter de manquer de contrôle négatif (IVS-0000 Polyclonal Control DNA [ADN de contrôle polyclonal IVS-000]). Si l'organisation de votre laboratoire ne facilite pas le regroupement d'échantillons, IVS-0000 Polyclonal Control DNA peut également être acheté séparément.

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

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

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

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

n = 2 × nbre d'échantillons + 4 Total

Par conséquent, le volume d'aliquote total pour chaque mélange mère = **n × 45 µL**.

Pour le mélange mère Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle des échantillons), le nombre de réactions (**m**) doit être :

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

m = nbre d'échantillons + 3 Total

- Par conséquent, le volume d'aliquote total pour le mélange mère Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle des échantillons) = **m × 45 µL**.

7.3.3. Ajouter 1,25 U (ou 0,25 µl à 5 U/µl) de DNA polymérase (ADN polymérase) Taq par réaction à chaque mélange mère.

- La quantité totale d'ADN polymérase Taq ajoutée à chaque mélange mère = **n × 0,25 µL** et **m × 0,25 µL** pour le mélange mère Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille contrôle des échantillons).
- Vortexer doucement pour mélanger.

7.3.4. Pour chaque réaction, aliquoter 45 µL de la solution appropriée de mélange mère + ADN polymérase dans les puits individuels d'une plaque pour PCR ou dans des tubes pour PCR.

7.3.5. Ajouter 5 µL de la matrice appropriée (ADN des échantillons, ADN de contrôle positif, ADN de contrôle négatif ou eau) dans les puits individuels contenant les solutions de mélanges mères respectives.

- Mélanger en aspirant et en refoulant plusieurs fois à l'aide d'une pipette.

7.3.6. Reboucher les tubes ou recouvrir la plaque de PCR.

- Les échantillons sont maintenant prêts à être amplifiés dans le thermocycleur.
- Si l'amplification ne peut pas être réalisée immédiatement après la préparation des réactifs, la plaque ou les tubes PCR peuvent être conservés entre 2°C et 8°C pendant 24 heures.

Guide pratique :

Pour chaque mélange mère et **n** réactions, mélanger :

n × **45 µL** de mélange mère

n × **0,25 µL** d'ADN polymérase Taq

Vortexer doucement pour mélanger.

Aliquoter **45 µL** de solution de mélange mère + ADN polymérase dans chaque puits de réaction

Ajouter **5 µL** de la matrice appropriée dans chaque puits

Volume total de la réaction = **50 µL**

7.4. Amplification

7.4.1. Amplifier les échantillons en utilisant le programme de PCR suivant :

- Utiliser l'option **calculated** (calculée) pour la mesure de la température avec les thermocycleurs BioRad MJ Research PTC.

Tableau 5 : Conditions de thermocyclage

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

7.4.2. Retirer la plaque ou les tubes d'amplification du thermocycleur.

- Bien que l'ADN amplifié soit stable à température ambiante pendant des périodes prolongées, les produits de PCR doivent être conservés entre 2°C et 8°C jusqu'à la détection. La détection doit être effectuée dans les 30 jours suivant l'amplification.

7.5. Détection sur gel – analyse d'hétéroduplex

- Ne pas réaliser d'analyse d'hétéroduplex sur les produits de PCR du mélange mère Specimen Control Size Ladder. Ignorer les étapes 7.5.1 à 7.5.2 et passer directement à l'étape 7.5.3.

7.5.0. Dénaturer 20 µL de produits PCR à 94°C pendant 5 minutes.

7.5.1. Refroidir rapidement pour réhybrider les produits PCR à 4°C (dans un bain d'eau glacée) pendant 60 minutes.

7.5.2. Préparer l'unité d'électrophorèse avec un gel de polyacrylamide TBE à 6 % non dénaturant et un tampon de migration 1X TBE.

7.5.3. Mélanger 20 µL de chaque échantillon avec 5 µL de tampon de charge non dénaturant de bleu de bromophénol 5X réfrigéré.

7.5.4. Déposer les 20 µL de mélange dans les puits individuels du gel.

7.5.5. Brancher le gel à 110 V pendant 2 à 3 heures ou 40 à 50 V 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.

7.5.6. Colorer les gels dans 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium (dans de l'eau ou du tampon 0,5X TBE) pendant 5 à 10 minutes.

7.5.7. Rincer les gels dans de l'eau pendant 5 à 10 minutes. Changer l'eau et recommencer.

7.5.8. Placer le gel sous lampes UV pour visualiser les bandes.

7.5.9. Photographier et interpréter les résultats. (Voir les sections 8 : *Interprétation des résultats* et 10 : *Valeurs attendues*)

7.6. Contrôle qualité

Positive and negative (or normal) controls are furnished with the kit and are to be run in singlicate each time the assay is performed to ensure proper performance of the assay. Analyser en outre un contrôle négatif sans ADN (*par ex.* de l'eau) pour tester la contamination du mélange mère (master mix) ou la contamination croisée des réactions PCR due à une technique stérile incorrecte. Un contrôle tampon peut aussi être ajouté afin de garantir l'absence de contamination du tampon employé pour remettre en suspension les échantillons. The values for the positive controls are provided under 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 figurant ci-dessous ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI.

Tableau 6. Tailles attendues des contrôles positifs recommandés

Mélange mère	Cible	ADN contrôle	N° de référence	Taille du produit en nucléotides (nt)
IGH Tube A	FR1-J _H	Plage de taille attendue IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	310 - 360 280 ^a , 325
IGH Tube B	FR2-J _H	Plage de taille attendue IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	250 - 295 260
IGH Tube C	FR3-J _H	Plage de taille attendue IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40881090	100 - 170 145
IGK Tube A	V _K -J _K	Plage de taille attendue IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	120 - 160, 190 - 210, 260 - 300 143
IGK Tube B	V _K -K _{de} + intron-K _{de}	Plage de taille attendue IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	210 - 250, 270 - 300, 350 - 390 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Différents gènes	Plage de taille attendue IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	100, 200, 300, 400, 600^b 100, 200, 300, 400, 600 ^b

^a**Remarque :** Une bande de 280 nt peut également être présente et correspond à un produit d'amplification connu situé juste en dehors de la plage de taille attendue pour IGH Tube A.

^b**Remarque :** Dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'obtenir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 600 nt.

8. Interprétation des résultats

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

8.1. Analyse

- 8.1.1. Signaler les échantillons pour lesquels l'amplification échoue après des analyses répétées comme « **Aucun résultat ne peut être fourni concernant cet échantillon, car il contenait de l'ADN en quantité ou qualité insuffisante pour l'analyse** ».
- 8.1.2. Répéter l'analyse des échantillons pour lesquels elle a été négative si la réaction du contrôle positif a échoué.
- 8.1.3. Si des échantillons analysés en double fournissent des résultats différents, les analyser et/ou évaluer à nouveau au cas où ils auraient été permutés.
- 8.1.4. Tous les contrôles des tests doivent être examinés avant l'interprétation des résultats des échantillons. Si les contrôles ne fournissent pas les résultats attendus, l'analyse n'est pas fiable et les échantillons ne peuvent pas être interprétés.

Tableau 7. Le tableau suivant décrit l'analyse de chacun des contrôles ainsi que les décisions qui s'imposent en fonction des résultats.

Type de contrôle	Résultat attendu	Résultat aberrant
Contrôle sans matrice	Aucune amplification, continuer l'analyse.	Amplification présente, répéter le test.
Contrôle polyclonal	La taille du produit est cohérente avec la taille attendue figurant dans la section 10.1 : <i>Taille attendue des produits</i> . Aucun réarrangement clonal n'est présent. Procéder à l'analyse.	Un réarrangement clonal est présent. Répéter le test.
Contrôle positif (Peut aussi être un contrôle d'extraction si le matériel du contrôle positif est soumis à des procédés d'extraction)	La taille du produit est cohérente avec la taille attendue figurant dans la section 10.1 : <i>Taille attendue des produits</i> . Continuer l'analyse.	Répéter le test.
Specimen Control Size Ladder (marqueur de taille de contrôle des échantillons) (Ce contrôle de l'amplification est <u>essentiel</u> pour les échantillons dont la qualité et la quantité sont inconnues.)	Si tous les pics de 100, 200, 300, 400 et 600 nt sont visibles, continuer l'analyse. Dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'obtenir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 600 nt. Continuer l'analyse.	Si aucune bande n'est visible, répéter le test <u>sauf si l'échantillon est positif</u> . Si seulement 1, 2 ou 3 bandes sont visibles, réévaluer l'échantillon afin de détecter toute dégradation éventuelle de l'ADN <u>sauf si l'échantillon est positif</u> .

8.2. Interprétation de l'échantillon

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

- Une ou deux bande(s) positive(s) proéminente(s)^a dans la plage de taille attendue est interprété comme :
 - 8.2.1. « Positif pour la détection de réarrangement(s) clonal(aux) de gène de chaîne lourde ou légère kappa d'immunoglobuline indicatif de la présence d'une population cellulaire clonale. Dans le contexte d'un critère de diagnostic global, les populations cellulaires clonales peuvent indiquer la présence d'une tumeur maligne hématologique. »
 - Une absence de bande(s) positive(s)^a dans la plage de taille attendue est interprété comme :
 - 8.2.2. « Négatif pour la détection de réarrangement(s) clonal(aux) de gène de chaîne lourde ou légère kappa d'immunoglobuline. »

^aRemarque : Les critères de définition d'une bande positive sont les suivants :

- Les produits des échantillons figurant dans la plage de taille attendue et produisant une ou des bandes séparées distinctes de toute traînée (« smear ») de fond correspondent à des bandes positives.

9. Limites de la procédure

- Ce test n'identifie pas 100 % des populations cellulaires clonales.
- Ce test ne peut pas détecter, de manière fiable, moins des cinq (5) cellules positive pour 100 cellules normales.
- Toujours interpréter les résultats des tests de clonalité moléculaire dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.
- Les analyses PCR sont sujettes à des interférences dues à la dégradation de l'ADN ou à l'inhibition de la PCR par l'EDTA, l'héparine ou d'autres agents.

10. Valeurs attendues

10.1. Taille attendue des produits amplifiés

- Les tailles des amplicons figurant ci-dessous ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI.

Tableau 8. Tailles attendues des produits d'amplification

Mélange mère	Cible	ADN contrôle	N° de référence	Taille du produit en nt
IGH Tube A	FR1-J _H	Plage de taille attendue	---	310 - 360
		IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	310 – 360
		IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	280 ^a , 325
		IVS-0019 Clonal Control DNA	40881090	345
IGH Tube B	FR2-J _H	Plage de taille attendue	---	250 - 295
		IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	250 – 295
		IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	260
		IVS-0019 Clonal Control DNA	40881090	285
IGH Tube C	FR3-J _H	Plage de taille attendue	---	100 - 170
		IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	100 – 170
		IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	---
		IVS-0019 Clonal Control DNA	40881090	145
IGK Tube A	V _K -J _K	Plage de taille attendue	---	120 - 160, 190 - 210, 260 - 300
		IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	135 – 155
		IVS-0007 Clonal Control DNA	40880370	143
IGK Tube B	V _K -K _{de} + intron-K _{de}	Plage de taille attendue	---	210 - 250, 270 - 300, 350 - 390
		IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	225 - 245, 265 - 285, 404 ^b
		IVS-0007 Clonal Control DNA	40880370	274, 282
Specimen Control Size Ladder	Différents gènes	Plage de taille attendue	---	100, 200, 300, 400, 600^c
		IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	100, 200, 300, 400, 600 ^c

^aRemarque : Une bande de 280 nt peut également être présente et correspond à un produit d'amplification connu situé juste en dehors de la plage de taille attendue pour IGH Tube A.

^bRemarque : La distribution normale des réarrangements du gène IGK est fortement tronquée en raison de la diversité de jonction limitée. Veuillez consulter l'article de Rock *et al.* pour une explication détaillée.⁵

^cRemarque : Dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'obtenir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 600 nt.

10.2. Données de l'échantillon

Les données figurant ci-dessous ont été obtenues avec les mélanges réactionnels indiqués. Les produits amplifiés ont été soumis à une analyse d'hétéroduplex.

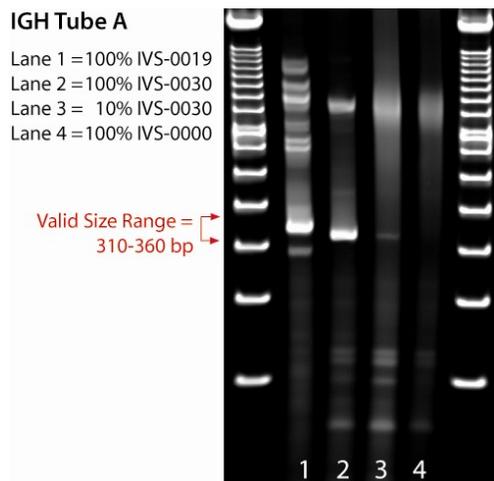


Figure 2. IGH Tube A

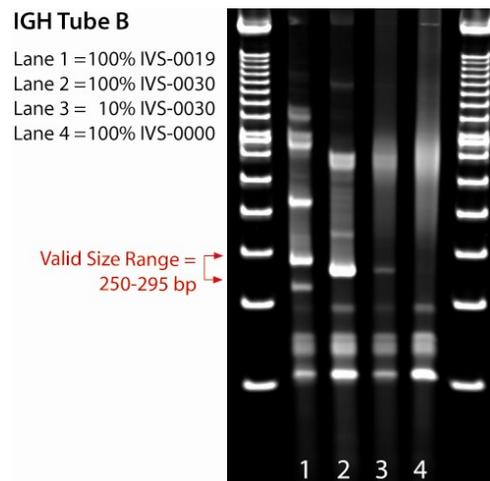


Figure 3. IGH Tube B

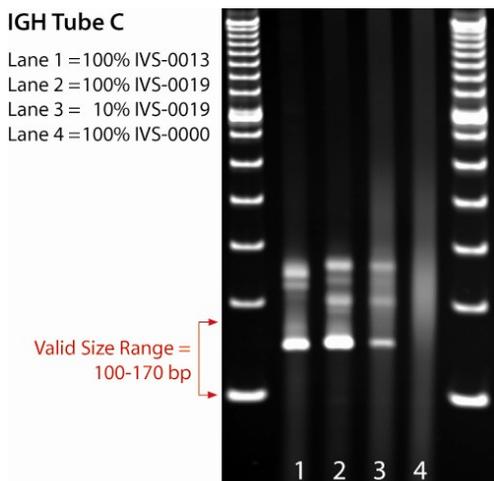


Figure 4. IGH Tube C

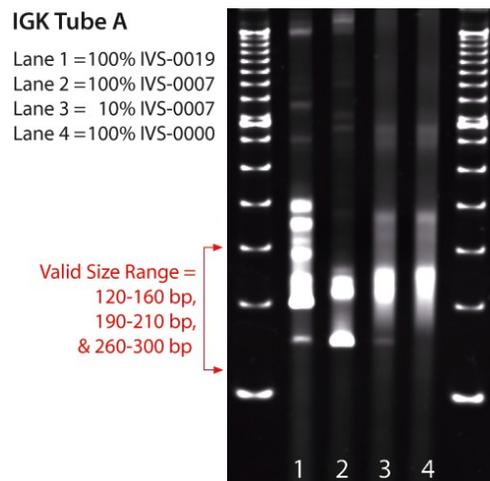


Figure 5. IGK Tube A

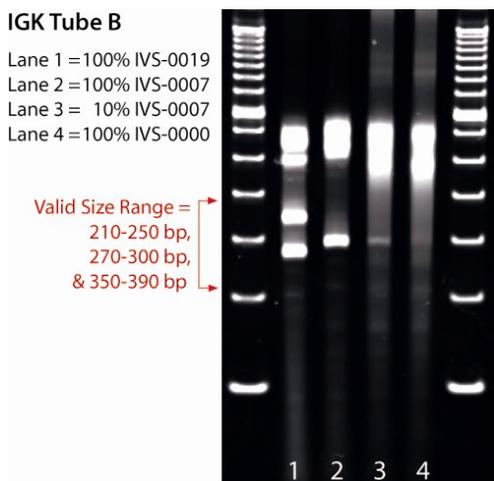


Figure 6. IGK Tube B

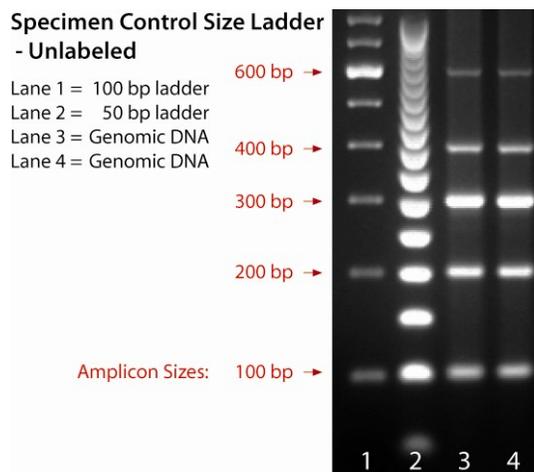


Figure 7. Mélange mère Specimen Control Size Ladder.

11. Caractéristiques de performance

Ce test PCR IdentiClone *IGH + IGK* B-Cell Clonality est une procédure rapide et fiable qui est bien plus sensible que l'analyse Southern Blot (SB) dans la détection de clonalité chez les patients chez qui l'on suspecte un syndrome lymphoprolifératif. Le diagnostic clinico-histopathologique final est en bonne corrélation avec les résultats de PCR chez un nombre plus élevé de patients en comparaison avec les résultats obtenus par Southern Blot.^{2,3}

Tableau 9.9 Études de la concordance

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

Tableau 10. PCR vs analyse SB concernant l'histopathologie et le diagnostic final

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

L'étude indépendante menée par Sandberg *et al.* a inclus 300 échantillons de patients appartenant à différents types d'échantillons³. Lorsque les analyses ont été effectuées à la fois par PCR et SB et que les résultats pouvaient être corrélés à l'histopathologie et au diagnostic final, la précision du diagnostic des tests IdentiClone sélectionnés a été définie comme étant d'au moins 96 %. La précision est bien meilleure qu'avec une analyse SB, laquelle n'a pas détecté 23 cas évidents de tumeurs malignes et sept tumeurs malignes probables dans le cadre de cette étude. L'utilisation des tests IdentiClone n'a généré aucun résultat faux positif évident et le niveau de précision était élevé.³ Outre le bénéfice manifeste de ce test, les résultats clonaux obtenus ont permis la détection ultérieure de réarrangements de gène spécifiques au patient et à la tumeur pour une détection de la maladie résiduelle minimale.

12. Bibliographie

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.* 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.* Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 21, 201-206.

13. Support technique et service client

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

Coordonnées

Invivoscribe, Inc.
10222 Barnes Canyon Road, Bldg. 1
San Diego CA 92121-2711
États-Unis

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

Représentant agréé et assistance technique au sein de l'Union européenne

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

Téléphone : +33 (0)4 42 01 78 10
Fax : +33 (0)4 88 56 22 89
Support technique : support@invivoscribe.com
Service client : sales-eu@invivoscribe.com
Site Internet : www.invivoscribe.com
Heures d'ouverture : 9 h à 17 h heure française

14. Symboles

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



Destiné au diagnostic *in vitro*



Date de péremption



Référence catalogue



Représentant agréé dans la Communauté européenne



Volume de réactif



Fabricant



Numéro de lot



Consulter le mode d'emploi



Conditions de conservation

15. Informations légales

15.1. Garantie et responsabilité

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

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

15.2. Brevets et marques commerciales

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

IdentiClone® est une marque déposée d'Invivoscribe®.

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

15.3. Avis à l'acheteur – EagleTaq DNA Polymerase (ADN polymérase EagleTaq) UNIQUEMENT

Ce produit est approuvé pour la vente et l'utilisation à des fins de recherche dans l'Espace économique européen (EEE) uniquement. Il est interdit de revendre ce produit ou de le transférer à un tiers. L'utilisation de ce produit est couverte par le brevet américain n° 6,127,155 et les demandes de brevet correspondantes en dehors des États-Unis. L'acheteur de ce produit peut utiliser cette quantité de produit uniquement afin de réaliser ses propres recherches internes. Aucun droit en vertu de toute autre demande de brevet et aucun droit de fournir des services commerciaux de quelque sorte que ce soit, y compris, mais sans s'y limiter, rapporter les résultats des activités de l'acheteur pour une contrepartie financière ou toute autre contrepartie commerciale, n'est accordé expressément, implicitement ou par préclusion. Ce produit est destiné à des fins de recherche uniquement. Les utilisations pour le diagnostic humain et vétérinaire conformément aux demandes de brevet Roche nécessitent une licence distincte de la part de Roche. Toutes les utilisations autres qu'à des fins de recherche interne et de diagnostic humain et vétérinaire conformément aux demandes de brevet Roche nécessitent une licence distincte de la part de Thermo Fisher Scientific. En utilisant ce produit, vous confirmez que vous acceptez ce qui précède. Pour obtenir de plus amples informations sur l'achat de licences de Roche, contacter le Licensing Department (service des licences) de Roche Molecular Systems, Inc., 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588, États-Unis ou Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim, Allemagne. Pour obtenir de plus amples informations sur l'achat de licences de Thermo Fisher Scientific, contacter le Licensing Department (service des licences) de Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008, États-Unis.