





## IdentiClone™ IGL Gene Clonality Assay



Pour l'Identification de Réarrangements Clonaux de Gène de Chaîne Légère Lambda d'Immunoglobulines

**IVD** Pour le Diagnostic *In Vitro*

### Symboles Clés Utilisés

<b>IVD</b>	Pour le Diagnostic <i>In Vitro</i>
<b>REF</b>	Référence du Catalogue
<b>VOL</b>	Volume de Réactif
<b>LOT</b>	Code du Lot
	Conditions de Conservation
	Date de Péréemption
<b>EC REP</b>	Mandataire Européen
	Fabricant
	Consultez la Notice d'Utilisation



Conditions de Conservation: **-65°C à -85°C**

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



Catalogue N°	Produits	Quantité
<b>REF</b> 9-103-0011	IdentiClone™ IGL Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Réactions
<b>REF</b> 9-103-0021	IdentiClone™ IGL Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Réactions

## Table des Matières

<b>1. MARQUE DEPOSEE</b> .....	<b>3</b>
<b>2. INDICATIONS</b> .....	<b>3</b>
<b>3. RESUME ET EXPLICATION DU TEST</b> .....	<b>3</b>
<b>4. PRINCIPES DE LA PROCEDURE</b> .....	<b>4</b>
4.1. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR).....	4
4.2. DETECTION PAR FLUORESCENCE DIFFERENTIELLE.....	4
<b>5. REACTIFS</b> .....	<b>5</b>
5.1. COMPOSITION DES REACTIFS .....	5
5.2. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS .....	5
5.3. CONSERVATION ET MANIPULATION .....	6
<b>6. INSTRUMENTS</b> .....	<b>6</b>
6.1. THERMOCYCLEUR .....	6
6.2. INSTRUMENTS D'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE ABI.....	6
<b>7. COLLECTE DES PRELEVEMENTS ET PREPARATION</b> .....	<b>6</b>
7.1. PRECAUTIONS.....	6
7.2. SUBSTANCES INTERFERENTES .....	6
7.3. CONDITIONS DES PRELEVEMENTS ET MANIPULATIONS.....	6
7.4. PREPARATION DES ECHANTILLONS .....	7
7.5. CONSERVATION DES ECHANTILLONS .....	7
<b>8. PROCEDURE D'ANALYSE</b> .....	<b>7</b>
8.1. MATERIELS FOURNIS .....	7
8.2. MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNI .....	7
8.3. PREPARATION DU REACTIF .....	8
8.4. AMPLIFICATION.....	9
8.5. DETECTION PAR ABI FLUORESCENCE .....	9
8.6. CONTROLE QUALITE .....	10
8.7. CONTROLES POSITIFS RECOMMANDES .....	10
<b>9. INTERPRETATION DES RESULTATS</b> .....	<b>11</b>
9.1. ANALYSE.....	11
9.2. INTERPRETATION DE L'ECHANTILLON.....	11
<b>10. LIMITES DE LA PROCEDURE</b> .....	<b>12</b>
<b>11. VALEURS ATTENDUES</b> .....	<b>12</b>
11.1. TAILLE ATTENDUE DES PRODUITS AMPLIFIES.....	12
11.2. DONNEES DE L'ECHANTILLON .....	13
<b>12. CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE</b> .....	<b>14</b>
<b>13. BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>14</b>
<b>14. SERVICE TECHNIQUE ET CLIENT</b> .....	<b>15</b>
<b>15. INFORMATIONS LEGALES</b> .....	<b>15</b>

## 1. Marque Déposée

IdentiClone™ *IGL* Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection  
 IdentiClone™ *IGL* Gene Clonality MegaKit Assay – ABI Fluorescence Detection

## 2. Indications

L'IdentiClone™ *IGL* 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 légère lambda d'immunoglobuline chez les patients à lymphoproliférations suspectes.

Spécifiquement, le test *IGL* Gene Clonality Assay peut être utilisé pour:

- Identifier la clonalité de syndromes lymphoprolifératifs atypiques
- Soutenir un diagnostic différentiel entre des lésions réactives et des malignités hématologiques
- Déterminer une lignée présumptive aux syndromes lymphoprolifératifs monoclonaux matures
- Identifier les marqueurs tumeur spécifiques (réarrangements de gène *IGL*) pour la surveillance après traitement
- Contrôler et évaluer la récurrence de la maladie

## 3. Résumé et Explication du Test

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<sup>1</sup>. Ce test PCR IdentiClone™ contient des amorces ADN à consensus multiples qui ciblent les régions génétiques conservées de la chaîne légère lambda des immunoglobulines. Ce test est utilisé pour détecter à partir de l'ADN la vaste majorité des malignités clonales à cellule B. 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.

Les tests Invivoscribe Technologies 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<sup>2</sup>.

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.

Ces tests en kits contiennent 2 mélanges réactionnels "master mixes". Le "master mix" *IGL* Tube cible les régions variable (V) et de jonction (J) du locus de la chaîne légère lambda d'immunoglobuline. Le deuxième "master mix", le "Specimen Control Size Ladder", cible plusieurs gènes et génère une série d'amplicons approximativement de 100, 200, 300, 400, et 600 paires de bases pour assurer que la qualité et quantité d'ADN introduite est suffisante pour l'obtention d'un résultat fiable. Un seul programme de thermocycleur et des méthodologies de détection similaires sont employés pour tous nos Tests de Clonalité Génique. Ceci améliore la cohérence et facilite l'apprentissage croisé d'une large gamme de tests différents.

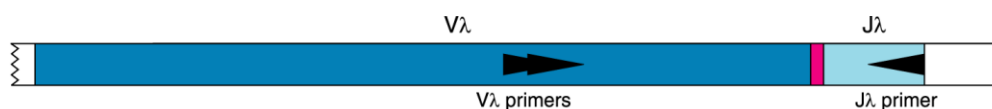
Ce test est basé sur l'action concertée de l'EuroClonality/BIOMED-2 BMH4-CT98-3936



## 4. Principes de la Procédure

### 4.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les analyses PCR sont utilisées en routine pour l'identification de populations clonales à cellule B. Ces tests amplifient l'ADN entre les amorces qui ciblent la région charpente ou "framework" (FR) conservée des régions variables (V) et les régions de jonction (J) conservées (*IGL Tube*). Ces régions conservées s'étendent de part et d'autre d'une zone de la région V-J où des réarrangements génétiques programmés se produisent durant 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 V-J fonctionnel unique en longueur et séquence. Ainsi, quand l'ADN d'une population normale ou polyclonale est amplifiée avec des amorces ADN qui flanquent la région V-J, une courbe en cloche (distribution gaussienne) des produits d'amplification est obtenue dans la 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 provenant d'échantillons contenant une population clonale, le résultat est de un ou deux produits majeurs d'amplification (amplicons) parmi un fond polyclonal réduit.



*IGL tube*: 2 Vλ primers + 1 Jλ primer

**Figure 1.** Représentation simplifiée de l'organisation d'un gène réarrangé de chaîne légère lambda d'immunoglobuline sur le chromosome 22q11.2. Les flèches noires représentent les positions relatives des amorces "primers". Les deux amorces Vλ ciblent Vλ1, 2, et 3 parce que ces trois familles couvrent approximativement 70% des segments de gène Vλ réarrangeables, et qu'approximativement 90% des réarrangements *IGL* impliquent ces trois familles. De même, l'amorce seule Jλ cible uniquement Jλ1, 2 et 3 parce que ces trois segments de gène Jλ sont impliqués dans 98% des réarrangements *IGL*.

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.

### 4.2. 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 inégale, 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.

## 5. Réactifs

### 5.1. Composition des Réactifs

<b>REF</b> 9-103-0011	IdentiClone™ <i>IGL</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Réactions
<b>REF</b> 9-103-0021	IdentiClone™ <i>IGL</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Réactions

Tableau 1

Réactif	Catalogue N°	Composants des Réactifs (ingrédients actifs)	Quantité unitaire	9-103-0011 Nb d'Unités	9-103-0021 Nb d'Unités	Temp. de Conservation
Master Mix	2-103-0011	<b>IGL Tube – 6FAM</b> Oligonucléotides multiples ciblant les régions variable et jonction du gène de chaîne légère lambda d'immunoglobuline en solution saline tamponnée.	1500 µL	1	10	-65 à -85°C
Master Mix Témoin d'Amplification	2-096-0021	<b>Specimen Control Size Ladder – 6FAM</b> Oligonucléotides multiples ciblant des gènes domestiques.	1500 µL	1	10	-65 à -85°C
Témoins ADNs Positifs	4-088-0550	<b>IVS-0010 Clonal Control DNA</b> 200 µg/mL d'ADN en solution à 1/10 <sup>ème</sup> TE	100 µL	1	5	2 à 8°C ou -65 à -85°C
	4-088-1690	<b>IVS-0029 Clonal Control DNA</b> 200 µg/mL d'ADN en solution à 1/10 <sup>ème</sup> TE	100 µL	1	5	2 à 8°C ou -65 à -85°C
Témoin ADN Négatif (Normal)	4-092-0010	<b>IVS-0000 Polyclonal Control DNA</b> 200 µg/mL d'ADN en solution à 1/10 <sup>ème</sup> TE	100 µL	1	5	2 à 8°C ou -65 à -85°C

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

### 5.2. 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.

### 5.3. Conservation et Manipulation

- Pour tout délai autre que celui d'une utilisation immédiate, les **kits d'analyse doivent être conservés entre -65°C et -85°C**.
- La température optimale de conservation des ADN contrôles est de 2°C à 8°C, mais les ADN contrôles peuvent être conservés entre -65°C et -85°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. Un vortexage excessif pourrait endommager l'ADN et causer la perte des fluorophores des amorces marquées.
- Les matériels sont stables jusqu'à la date de péremption 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.

## 6. Instruments

### 6.1. Thermocycleur

- Utilisation ou Fonction: Amplification d'échantillons d'ADN
- 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 8.4 *Amplification* pour le programme du thermocycleur.

### 6.2. Instruments d'Electrophorèse 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 8.5 *Détection par ABI Fluorescence* pour la préparation des échantillons.

## 7. Collecte des prélèvements et préparation

### 7.1. 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.

### 7.2. Substances Interférentes

Les substances suivantes sont connues pour interférer avec la PCR:

1. Cations divalents chélateurs
2. Cônes de pipette à rétention minimale
3. EDTA (non significatif à faible concentration)
4. Héparine

### 7.3. Conditions des prélèvements et Manipulations

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

1. 5cc 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)

2. 5mm cube minimum de tissu (conservé et expédié congelé ou conservé et expédié en RPMI 1640 à température ambiante ou dans de la glace)
3. 2µg d'ADN génomique (conservé entre 2°C et 8°C et expédié à température ambiante)
4. Tissu ou coupes fixés à la Formaline et inclus en paraffine (conservés et expédiés à température ambiante)

#### 7.4. 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<sup>ème</sup> 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 générera un résultat fiable. Par conséquent, 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.

#### 7.5. Conservation des échantillons

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

## 8. Procédure d'Analyse

### 8.1. Matériels Fournis

Tableau 2

Catalogue N°	Description
2-103-0011	IGL Tube – 6FAM
2-096-0021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM
4-088-0550	IVS-0010 Clonal Control DNA
4-088-1690	IVS-0029 Clonal Control DNA
4-092-0010	IVS-0000 Polyclonal Clonal Control DNA

### 8.2. Matériels Requis Mais Non Fourni

Tableau 3

Réactif/Matériel	Réactifs Recommandés /Matériels et Fournisseurs	Notes
ADN Polymérase	Roche: EagleTaq DNA Polymerase (Cat# 05206944190) ou équivalent	N/A
Eau Distillée Déionisée de Biologie Moléculaire ou Stérile USP	N/A	L'eau doit être stérile et exempte de toute DNase et RNase.
Pipettes Calibrées	Rainin: Pipettes P-2, P-20, P-200, et P-1000 Ou pipettes SL-2, SL-20, SL-200, et SL-1000	Doit être capable de mesurer précisément des volumes allant de 1µl à 1000µl.
Thermocycleur	Bio-Rad: MJ Research PTC-100 ou PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer PE 9600 ou PE 9700	N/A
Vortex	N/A	N/A
Plaques ou tubes PCR	N/A	Stériles
Cônes de pipette à filtre	N/A	Stériles, exempts de RNase/DNase/Pyrogène
Tubes Microcentrifuges	N/A	Stériles
Instrument ABI Electrophorèse Capillaire	Applied Biosystems: ABI séries 310, 3100, 3130, ou 3500.	N/A
Formamide Hi-Di	Invivoscribe Technologies: Hi-Deionized Formamide (Cat N° 6-098-0041) Applied Biosystems: Hi-Di™ Formamide (Cat N° 4311320)	N/A
Marqueur de Taille	Invivoscribe Technologies: Hi-Di Formamide w/ROX size standards for ABI 310 (Cat N° 6-098-0051)	N/A

Réactif/Matériel	Réactifs Recommandés /Matériels et Fournisseurs	Notes
	Hi-Di Formamide w/ROX size standards for ABI 3100 (Cat N° 6-098-0061) Applied Biosystems: Pour les instruments ABI 3100 ou 3130: GeneScan™ - 400HD [ROX]™ (Cat N° 402985) Pour les instruments ABI 3500: GeneScan™ - 600 [LIZ]™ v2.0 (Cat N° 4408399)	
<b>Jeux de Fluorophores (Dye Set) pour Calibration Spectrale</b>	Applied Biosystems: Pour les instruments ABI 3100 et 3130: DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D) (Cat N° 4345827) Pour les instruments ABI 310: NED Matrix Standard (Cat N° 402996) et Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX] (Cat N° 401546) Pour les instruments ABI 3500 : DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) (Cat N° 4345833)	Jeux de fluorophores utilisés pour la calibration spectrale d'instrument ABI utilisé avec 6FAM, HEX, NED, et ROX
<b>Polymère</b>	Applied Biosystems: POP-4 Polymer: POP-4™ for 310 Genetic Analyzers (Cat N° 402838) POP-4™ for 3100/3100-Avant Genetic Analyzers (Cat N° 4316355) POP-4™ for 3130/3130xL Genetic Analyzers (Cat N° 4352755) POP-7 Polymer: POP-7™ for 3130/3130xL Genetic Analyzers (Cat N° 4352759) POP-7™ for 3500/3500xL Genetic Analyzers (Cat N° 4393714)	N/A
<b>Tampon</b>	Applied Biosystems: 10X Genetic Analyzer Buffer with EDTA (Cat N° 402824)	Diluer au 1/10 <sup>ème</sup> dans de l'eau stérile avant utilisation

### 8.3. 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.
1. Après vous être muni de gants, enlever les Master Mixes du congélateur. Laisser les tubes décongeler complètement; puis vortexer doucement pour mélanger.
  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 45µl pour chaque réaction. Nous recommandons d’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:

<b>n = 2 × Nbre d’échantillon</b>	(tester chaque échantillon en double)
+ 1	ADN contrôle positif (Voir section 8.7 <i>Contrôles Positifs Recommandés</i> )
+ 1	ADN contrôle négatif (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	Témoin négatif PCR sans ADN (eau)
+ 1	pour corriger l’erreur de pipetage
<b>n = 2 × Nbre d’échantillon + 4</b>	<b>Total</b>

Le volume total d’aliquote pour chaque Master Mix doit être **n** × 45µl.

Pour le Master Mix du Specimen Control Size Ladder Marquer, le nombre de réactions (**m**) doit être:

<b>m = Nbre d’échantillon</b>	(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
<b>m = Nbre d’échantillon + 3</b>	<b>Total</b>

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



3. Ajouter 1.25 unités (ou 0.25µl à 5 unités/µl) d'ADN polymérase EagleTaq à chaque Master Mix par réaction. L'ADN polymérase EagleTaq totale ajoutée à chaque Master Mix doit être de  $n \times 0.25\mu\text{l}$ , et  $m \times 0.25\mu\text{l}$  pour le Master Mix du Specimen Control Size Ladder. Vortexer doucement pour mélanger.
  4. Pour chaque réaction, aliquoter 45µl du Master Mix approprié + la solution d'ADN polymérase dans les puits individuels d'une plaque ou dans un tube PCR.
  5. Ajouter 5µl de matrice appropriée (échantillon d'ADN, ADN contrôle positif, ADN contrôle négatif, ou eau) aux puits individuels contenant les solutions de Master Mix respectives. Aspirer et refouler plusieurs fois pour mélanger.
  6. Reboucher ou couvrir la plaque PCR.
  7. 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.

**Résumé:** Pour chaque Master Mix et n réactions, mélanger:  
 $n \times 45\mu\text{l}$  de Master Mix  
 $n \times 0.25\mu\text{l}$  d'ADN polymérase EagleTaq  
 Vortexer doucement pour mélanger.  
 Aliquoter **45µl** de Master Mix + la solution d'ADN polymérase dans chaque puit de réaction.  
 Ajouter **5µl** de matrice appropriée dans chaque puit.  
 Volume Total de réaction = **50µl**

#### 8.4. Amplification

1. Amplifier les échantillons en utilisant le programme PCR suivant:  
 (Note: Nous recommandons l'utilisation de l'option **calculée** pour la mesure de la température avec les thermocycleurs BioRad MJ Research PTC.)

##### Programme Standard pour l'EagleTaq

Etape 1: 95°C pendant 7 minutes  
 Etape 2: 95°C pendant 45 secondes  
 Etape 3: 60°C pendant 45 secondes  
 Etape 4: 72°C pendant 90 secondes  
 Etape 5: retour à l'Etape 2; répéter 34 fois  
 Etape 6: 72°C pendant 10 minutes  
 Etape 7: 15°C fin

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.

#### 8.5. Détection par ABI Fluorescence

- Veuillez 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

1. Dans un tube Microcentrifuge neuf, mélanger une quantité appropriée (pour un total de 10µl par réaction PCR) de Formamide Hi-Di avec les Marqueurs<sup>a</sup> de taille ROX. Bien vortexer.
2. Dans une plaque PCR 96-puits, ajouter 10µl de Formamide Hi-Di avec les Marqueurs de taille ROX dans un puit individuel pour chaque réaction PCR.

3. Transférer 1µl 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.
4. Reboucher ou couvrir la plaque ou les tubes PCR.
5. Dénaturer à la chaleur les échantillons à 95°C pendant 2 minutes puis réfrigérer brusquement dans de la glace pendant 5 minutes.
6. Préparer une **liste des échantillons** et une **liste d'injection** des échantillons.
7. Analyser les échantillons avec l'instrument d'électrophorèse capillaire ABI en suivant le manuel d'utilisation<sup>b</sup>.
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 9 *Interprétation des Résultats* et 11 *Valeurs Attendues* ci-dessous.)

#### Plates-formes ABI 3500:

**Note :** En raison d'écart 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.

1. 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<sup>a</sup>. Bien Vortexer.
2. 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.
3. 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.
4. Reboucher ou couvrir la plaque PCR.
5. Dénaturer à la chaleur les échantillons à 95 °C pendant 3 minutes, puis réfrigérer brusquement dans de la glace pendant 5 minutes.
6. Préparer une liste d'échantillons et une liste d'injection des échantillons.
7. Analyser les échantillons avec un instrument d'électrophorèse capillaire ABI 3500 en suivant le manuel d'utilisation<sup>b</sup>.
8. 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 9 *Interprétation des résultats* et 11 *Valeurs Attendues*).

**Note <sup>a</sup>:** 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.

**Note <sup>b</sup>:** Quand les échantillons sont passés dans la machine, ils sont fractionnés, détectés et analysés par l'instrument. Les tests durent 20-24 minutes. Les instruments d'électrophorèse capillaire ABI sont habituellement capable d'effectuer 2 tests par heure (pour les instruments à 16 et 24 capillaires, ceci est équivalent à respectivement 768 et 1152 échantillons par jour), analysent et conservent automatiquement les données pour révision ou comparaison avec d'autres résultats d'analyse.

### **8.6. 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 11.1 *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 Technologies.

### **8.7. Contrôles Positifs Recommandés**

- Les tailles des amplicons listées sont déterminées en utilisant une plateforme ABI 3100. 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.
- **Note:** "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 4**

Master Mix	Cible	Couleur	ADN Contrôle	Catalogue N°	Taille du Produit en Nucléotides <sup>2</sup>
IGL Tube	Vλ-Jλ	Bleu	Taille Attendue	---	135-170

Master Mix	Cible	Couleur	ADN Contrôle	Catalogue N°	Taille du Produit en Nucléotides <sup>2</sup>
			IVS-0010 Clonal Control DNA IVS-0029 Clonal Control DNA	4-088-0550 4-088-1690	139 143, 156
Specimen Control Size Ladder	Gènes Multiples	Bleu	Taille Attendue IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 4-092-0010	<b>100, 200, 300, 400, 600<sup>a</sup></b> 100, 200, 300, 400, 600 <sup>a</sup>

**Note <sup>a</sup>:** 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 600nt. Pour la détection par fluorescence ABI le pic 600nt peut ne pas apparaître pendant les temps normaux d'analyse. De plus, la taille des pics peut différer de plus de 30nt lorsque la taille du fragment est extrapolée avec les marqueurs de taille GeneScan - 400HD [ROX].

## 9. 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.

### 9.1. 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. Si les contrôles ne produisent pas les résultats attendus, l'analyse n'est pas fiable et les échantillons ne doivent pas être interprétés.**

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

Tableau 5

Type de Contrôle	Résultats Attendus	Résultats Aberrants
<b>No Template Control</b>	Aucune amplification, continuer l'analyse	Amplification présente, refaire l'analyse.
<b>Polyclonal Control</b>	La taille du produit est cohérente avec la taille attendue listée dans la section <i>11.1 Taille Attendue des Produits Amplifiés</i> . Aucun réarrangement clonal n'est présent. Continuer l'analyse.	Des réarrangements clonaux sont présents. Refaire l'analyse.
<b>Positif Control</b> (Peut aussi être un contrôle d'extraction si le matériel du contrôle positif est prélevé par un procédé d'extraction)	La taille du produit est cohérente avec la taille attendue listée dans la section <i>11.1 Taille Attendue des Produits Amplifiés</i> . Continuer l'analyse.	Refaire l'analyse.
<b>Specimen Control Size Ladder</b> (Ce contrôle d'amplification est <u>essentiel</u> pour les échantillons de quantité et qualité inconnues.)	Si tous les pics de 100, 200, 300, 400, et 600nts sont visibles, continuer l'analyse. Parce que des fragments d'ADN plus petits sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare pour le fragment 600nt 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> .

### 9.2. 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)<sup>a</sup> dans la gamme de taille attendue est interprété comme:

**“Positif pour la détection de réarrangement(s) clonal(aux) de gène de chaîne légère lambda d’immunoglobuline 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<sup>a</sup> dans la gamme de taille attendue est interprété comme:

**“Négatif pour la détection de réarrangement(s) clonal(aux) de gène de chaîne légère lambda d’immunoglobuline.”**

**Note<sup>a</sup>: 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.

## 10. 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.

## 11. Valeurs Attendues

### 11.1. Taille Attendue des Produits Amplifiés

- Les tailles des amplicons listées ont été déterminées avec une plateforme ABI 3100. 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.
- **Note:** “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**

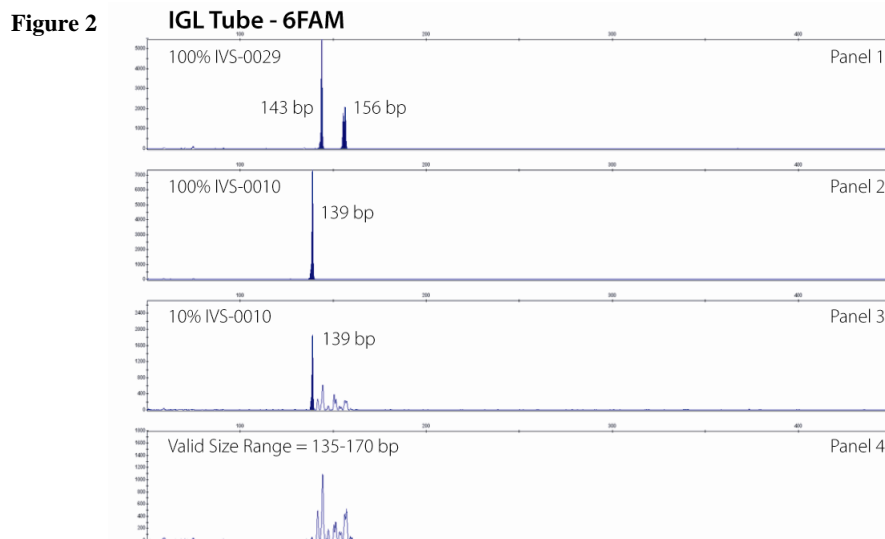
Master Mix	Cible	Couleur	ADN Contrôle	Catalogue N°	Taille du Produit en Nucléotides <sup>2</sup>
IGL Tube	Vλ-Jλ	Bleu	<b>Taille Attendue</b> IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0010 Clonal Control DNA IVS-0029 Clonal Control DNA	--- 4-092-0010 4-088-0550 4-088-1690	<b>135-170</b> 135-170 139 143, 156
Specimen Control Size Ladder	Gènes Multiples	Bleu	<b>Taille Attendue</b> IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 4-092-0010	<b>100, 200, 300, 400, 600<sup>a</sup></b> 100, 200, 300, 400, 600 <sup>a</sup>

**Note<sup>a</sup>:** 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 600nt. Pour la détection par fluorescence ABI le pic 600nt peut ne pas apparaître pendant les temps normaux d’analyse. De plus, la taille des pics peut différer de plus de 30nt lorsque la taille du fragment est extrapolée avec les marqueurs de taille GeneScan - 400HD [ROX].

## 11.2. Données de l'échantillon

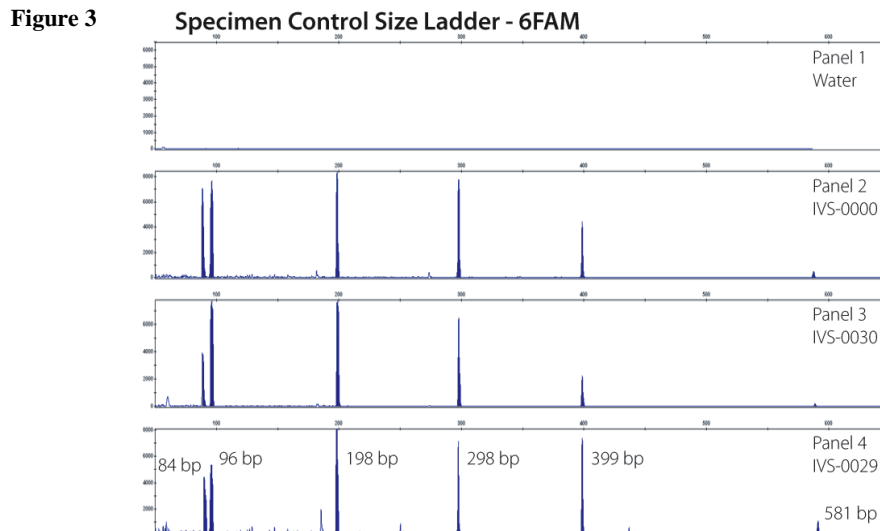
Les données montrées ci-dessous ont été produites avec le Master Mix indiqué. Les produits amplifiés ont été analysés sur un instrument ABI 3100. ("Valid Size Range" = Taille Attendue).

- Panel 1 présente les résultats obtenus en testant un ADN contrôle clonal alternatif à 100%.
- Panel 2 présente les résultats obtenus en testant l'ADN contrôle clonal recommandé à 100%.
- Panel 3 présente les résultats obtenus en testant une dilution à 10% de l'ADN contrôle clonal recommandé.
- Panel 4 présente les résultats obtenus en testant un ADN contrôle polyclonal IVS-0000.



Pour le Specimen Control Size Ladder Master Mix:

- Panel 1 présente les résultats obtenus en testant un contrôle négatif d'eau.
- Panel 2 présente les résultats obtenus en testant un contrôle positif recommandé, ADN contrôle polyclonal IVS-0000.
- Panels 3 et 4 présente les résultats obtenus en testant deux contrôles différents ADNs contrôles clonaux à 100%.



## 12. Caractéristiques de Performance

Ce test PCR IdentiClone™ *IGL* 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 une étude de référence publiée en 2003 dans *Leukemia* par Van Dongen *et al.*

**Tableau 7**

Concordance PCR/SB (*Leukemia*<sup>2</sup>):

*IGH*: 93% sensibilité / 92% spécificité

*IGK*: 90% sensibilité / 90% spécificité

*IGL*: 86% sensibilité / 92% spécificité

*TCRB*: 86% sensibilité / 98% spécificité

*TCRG*: 89% sensibilité / 94% spécificité

*TCRD*: 83% sensibilité / 95% spécificité

La précision du diagnostique des tests IdentiClone™ sélectionnés fut déterminée comme étant d'au moins 96%. Il n'y eu aucun résultat faux positif évident avec les tests IdentiClone™ et il y avait un niveau élevé de précision. De plus un bénéfice évident de cette analyse est 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.

## 13. Bibliographie

1. Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Mol. Diag.* 1999, **4**(2):101-117.
2. Van Dongen, JJM *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003, **17**(12):2257-2317.

## 14. Service Technique et Client

### Coordonnées

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

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

### Mandataire et Assistance Technique CE



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

Téléphone: +33 (0)4 42 01 78 10  
Fax: +33 (0)4 88 56 22 89  
Service Technique: support@invivoscribe.com  
Service Client: sales-eu@invivoscribe.com  
Site Internet: www.invivoscribe.com  
Ouvert de: 9:00 à 17:00 CET/CEST

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.

## 15. Informations Légales

Ce produit est destiné au diagnostic *in vitro*. Ce produit est couvert par un ou plusieurs des brevets suivants et de demandes brevets détenus par ou sous licence exclusive à Invivoscribe Technologies, Inc: Brevet Européen N° EP 1549764B1 et d'autres applications de Brevet en attente provenant des demandes Européennes de Brevet N° 03756746.8 et 047326551.9 (16 pays), Brevet Américain N° 7,785,783, Brevet Japonais N° JP04708029B2, demande de Brevet Américain N° 10/531,106, demande de Brevet Brésilien N° PI0410283.5, demande de Brevet Canadien N° 2525122, demande de Brevet Indien N° 5792/DELNP/2005, demande de Brevet Japonais N° 2006-529437, demande de Brevet Mexicain N° PA/a/2005/012102, demande de Brevet Chinois N° 200480016603.5 et demande de Brevet Coréen N° 10-2005-7021561.

L'utilisation de ce produit peut nécessiter des méthodes d'amplification des acides nucléiques tels que la "Polymerase Chain Reaction" (PCR). Les licences nécessaires à la pratique des méthodes d'amplification ou à l'utilisation des enzymes d'amplification ou d'équipements couverts par les brevets de tiers, sont de la responsabilité de l'utilisateur et aucune licence n'est accordée par Invivoscribe Technologies, Inc, expressément ou implicitement.

**IdentiClone™** est une marque déposée par Invivoscribe Technologies, Inc.