

# Instrucciones de uso

# CE IVD

# IdentiClone® IGL Gene Clonality Assay

Para la identificación de reordenamientos genéticos de la cadena ligera lambda de la inmunoglobulina (IGL) clonal.

Para uso diagnóstico in vitro





Condiciones de conservación: -85°C a -65°C (Los controles de ADN pueden separarse de los kits de ensayo y conservarse a entre 2°C y 8°C)

# Índice

1.	Uso pr	EVISTO	3
2.	RESUM	EN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA	3
	2.1.	Antecedentes	3
	2.2.	Descripción general	
3.	PRINCI	PIOS DEL PROCEDIMIENTO	4
	3.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	4
	3.2.	Detección mediante gel	
4.	REACT	IVOS	5
	4.1.	Componentes del reactivo	5
	4.2.	Advertencias y precauciones	
	4.3.	Conservación y manipulación	
5.	Instru	JMENTAL	7
	5.1.	Termociclador	7
	5.2.	Unidad de electroforesis	
	5.3.	Unidad de iluminación UV	
6.	RECOGI	DA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	8
	6.1.	Precauciones	
	6.2.	Sustancias que pueden interferir	
	6.3.	Requisitos y manipulación de las muestras	
	6.4.	Preparación de las muestras	
	6.5.	Conservación de las muestras	
7.	PROCEI	DIMIENTO DE ENSAYO	9
		Materiales suministrados	
	7.1.		
	7.2.	Materiales necesarios (no suministrados)	
	7.3. 7.4.	•	
	7.4. 7.5.	Amplificación	
	7.5. 7.6.	Detección en gel – Análisis de heterodúplex	
	7.6. 7.7.	Control de calidad	
8.		PRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	
0.			
	8.1. 8.2.	AnálisisInterpretación de las muestras	
		·	
9.	Limita	CIONES DEL PROCEDIMIENTO	14
10.	VALOR	ES PREVISTOS	14
		Tamaño previsto de los productos amplificados	
	10.2.	Datos de la muestra	14
11.	CARAC	TERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	15
12.	Biblio	GRAFÍA	15
13.	Servic	IO TÉCNICO Y ATENCIÓN AL CLIENTE	15
14.	Símbo	LOS	16
15.		LEGAL	
		Garantía y responsabilidad	
		Patentes y marcas registradas	
		Aviso para el comprador: SOLO para DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq	

# 1. Uso previsto

IdentiClone *IGL* Gene Clonality Assay es un producto de diagnóstico *in vitro* diseñado para la detección mediante PCR de reordenamientos genéticos de la cadena ligera lambda de la inmunoglobulina clonal en pacientes con sospecha de neoplasias linfoproliferativas que puede utilizarse para:

- Identificar la presencia de clonalidad en neoplasias linfoproliferativas atípicas
- Respaldar un diagnóstico diferencial de lesiones reactivas y neoplasias hemáticas
- Asignar el supuesto linaje de las neoplasias linfoproliferativas monoclonales maduras
- Identificar marcadores tumorales específicos (reordenamientos genéticos de IGL) para la supervisión posterior al tratamiento
- Controlar y evaluar las recidivas de la enfermedad

# 2. Resumen y explicación de la prueba

#### 2.1. Antecedentes

El reordenamiento de los genes del receptor de antígenos se produce durante la ontogenia de los linfocitos B y T. Estos reordenamientos génicos generan productos únicos para cada célula en cuanto a longitud y secuencia. Por eso, las pruebas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sirven para identificar poblaciones de linfocitos derivadas de una única célula mediante la detección del reordenamiento único de los genes V-J de los loci del receptor del antígeno. Esta prueba por PCR utiliza distintos cebadores de ADN de consenso que se dirigen a regiones genéticas conservadas del gen de la cadena ligera lambda de la inmunoglobulina (*IGL*). Esta prueba, basada en ADN, sirve para detectar la gran mayoría de las neoplasias de los linfocitos B clonales. Los resultados de la prueba pueden analizarse con distintos métodos de detección, como la electroforesis en gel y capilar.

Las pruebas IdentiClone de Invivoscribe representan un nuevo enfoque para las pruebas de clonalidad mediante PCR. Estas pruebas estandarizadas se han optimizado minuciosamente mediante el análisis de muestras de control positivo y negativo con distintas mezclas de reacción. Tras el desarrollo de la prueba se completó una importante fase de validación, que incluyó el análisis de más de 400 muestras clínicas de acuerdo con la clasificación Revised European/American Lymphoma (REAL). Este análisis se realizó en más de treinta conocidos centros de análisis de toda Europa, como parte de un estudio colaborativo denominado BIOMED-2 Concerted Action.<sup>2</sup>

Las pruebas de detección mediante gel no detectan de forma fiable aquellas poblaciones clonales que representan menos del 5 % de la población de linfocitos total. Los resultados de las pruebas de clonalidad molecular siempre deben interpretarse en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.

### 2.2. Descripción general

Este kit de prueba incluye dos (2) mezclas de reacción. La mezcla de reacción del *IGL* Tube (Tubo de IGL) se dirige a las regiones variables (V) y de unión (J) del locus de la cadena ligera lambda de la inmunoglobulina. Specimen Control Size Ladder Master Mix (Mezcla de reacción de control de la muestra con marcador de tamaño) se dirige a distintos genes para generar una serie de amplicones de aproximadamente 100, 200, 300, 400 y 600 pares de bases y garantizar que la calidad y la cantidad de ADN sean suficientes para que el resultado sea válido. En todas las pruebas de clonalidad génica se usa un solo programa del termociclador y un método de detección similar, lo que mejora la uniformidad y facilita la formación cruzada en una amplia variedad de pruebas diferentes.

Esta prueba se basa en EuroClonality/BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.



# 3. Principios del procedimiento

## 3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las pruebas por PCR suelen utilizarse para identificar poblaciones clonales de linfocitos B. Estas pruebas amplifican el ADN situado entre cebadores dirigidos al marco (FR) conservado de las regiones variables (V) y de unión (J) conservadas (mezcla de reacción del *IGL* Tube (Tubo de IGL). Las regiones conservadas se encuentran a ambos lados de una zona de la región V-J en la que se producen los reordenamientos genéticos programados durante la maduración de los linfocitos B y T. Los genes del receptor de antígenos sujetos a reordenamiento son la cadena pesada de la inmunoglobulina, las cadenas ligeras de los linfocitos B y los genes del receptor de linfocitos T de los linfocitos T. Cada linfocito B y T presenta un solo reordenamiento V-J productivo que es único en cuanto a longitud y secuencia. Cuando el ADN de una población normal o policlonal se amplifica usando los cebadores de ADN que flanquean la región V-J, se genera una curva en forma de campana (distribución de Gauss) de amplicones que se ajustan al intervalo de tamaños previsto. Esta distribución de Gauss refleja la heterogeneidad de los reordenamientos en V-J. En ciertos casos, en ausencia de ADN de los linfocitos, no se detecta el producto. El ADN de las muestras de población clonal da lugar a uno o dos productos amplificados prominentes (amplicones) en un fondo policlonal disminuido.



Figura 1. La imagen recoge la representación de la organización de un reordenamiento genético de la cadena ligera lambda de la inmunoglobulina en el cromosoma 22q11.2. Las flechas negras representan las posiciones relativas de los cebadores. Los dos cebadores Vλ se dirigen a Vλ1, 2 y 3 porque estas tres familias cubren aproximadamente el 70 % de los segmentos del gen Vλ reordenables y aproximadamente el 90 % de todos los reordenamientos genéticos de *IGL* involucran a estas tres familias. Del mismo modo, el cebador Jλ único solo se dirige a Jλ1, 2 y 3 porque estos tres segmentos del gen Jλ están involucrados en el 98 % de todos los reordenamientos del gen *IGL*.

Dado que los genes del receptor de antígenos son polimórficos (están formados por una población heterogénea de secuencias de ADN relacionadas), es dificil emplear un solo conjunto de secuencias de cebadores de ADN para dirigirse a todas las regiones conservadas que flanquean el reordenamiento V-J. La diversidad de la región N y la mutación somática mezclan aún más las secuencias de ADN en estas regiones. Por lo tanto, son necesarias varias mezclas de reacción, dirigidas a distintas regiones FR, para identificar la mayor parte de los reordenamientos clonales. Como se ha indicado anteriormente, los reordenamientos clonales se identifican como productos prominentes de un solo tamaño en un fondo de amplicones de distintos tamaños que forman una distribución de Gauss en torno a un reordenamiento estadísticamente favorecido de tamaño medio.

### 3.2. Detección mediante gel

La electroforesis en gel, como la electroforesis en gel de agarosa o la electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante (PAGE), se usa habitualmente para resolver los diferentes productos del amplicón en función de su tamaño, carga y conformación. Dado que el ADN está cargado negativamente, cuando se aplica un potencial eléctrico (voltaje) a través del gel que contiene los productos de la PCR, el campo eléctrico hace que los amplicones se desplacen a través del gel. Los fragmentos de ADN más pequeños pueden desplazarse fácilmente a través de la matriz del gel, mientras que los fragmentos más grandes lo hacen más lentamente, provocando la separación de los productos del amplicón en función del tamaño. A continuación se puede usar bromuro de etidio u otros colorantes por intercalación del ADN para teñir y detectar estos productos en el gel.

También se puede realizar un análisis de heterodúplex y ejecutarlo en un gel de poliacrilamida para diferenciar los productos clonales y no clonales de la PCR. El análisis de heterodúplex implica desnaturalizar los productos de la PCR con una temperatura elevada y luego volver a hibridar rápidamente las cadenas de ADN reduciendo repentinamente la temperatura. Esto hace que una gran parte de las cadenas de ADN se unan incorrectamente a otras cadenas no homólogas, creando bucles en el ADN. Estos bucles provocan una reducción importante de la capacidad del ADN para desplazarse a través de un gel de poliacrilamida. No obstante, si la mayoría de los productos de la PCR son clonales, cuando se realiza un análisis de heterodúplex, la mayor parte de estos productos de PCR se volverán a hibridar correctamente con una cadena homóloga y pasarán normalmente a través del gel de poliacrilamida. Por lo tanto, el análisis de heterodúplex de una muestra clonal con un fondo policlonal hará que la mayor parte del producto policlonal fluya mucho más lentamente a través del gel de poliacrilamida, incrementando de esta forma su separación y la capacidad de identificar las bandas clonales.

# 4. Reactivos

# 4.1. Componentes del reactivo

Tabla 1: Ensayos disponibles

N.º de catálogo	Descripción	Cantidad
<b>REF</b> 91030010	IdentiClone IGL Gene Clonality Assay – Gel Detection	33 reacciones

Reactivo	N.º de catálogo (REF)	Componentes del reactivo (ingredientes activos)	Cantidad por unidad	N.º de unidades de 91030010	Temp. de conservación
Mezclas de reacción	21030010CE	GL Tube – Unlabeled Tubo de IGL – Sin marcar) istintos oligonucleótidos dirigidos la región $V\lambda$ y a la región $J\lambda$ del gen de la adena ligera lambda de la inmunoglobulina en olución salina tamponada.		[ <sub>∕</sub> -65°C	
Mezcla de reacción de control de amplificación del molde	20960020	Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (Control de la muestra con marcador de tamaño - Sin marcar) Distintos oligonucleótidos dirigidos a genes de mantenimiento.	1500 µL	1	-85°C <b>1</b>
ADN de control	40880550	IVS-0010 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0010) 200 µg/mL de ADN en solución TE 1/10	100 µL	1	Ո <b>շ8°</b> C
positivo	40881690	IVS-0029 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0029) 200 µg/mL de ADN en solución TE 1/10	100 µL	1	2°C -65°C
ADN de control negativo (normal)	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de control policlonal IVS-0000) 200 μg/mL de ADN en solución ΤΕ 1/10	100 µL	1	-85°C <u>~</u> 8

## 4.2. Advertencias y precauciones

- Este producto es para uso diagnóstico in vitro.
- Utilice este kit de ensayo a modo de sistema. No utilice reactivos de otros fabricantes. Cualquier alteración del protocolo —como la realización de diluciones o reducciones de las reacciones de amplificación— puede afectar al rendimiento de la prueba e implicar la anulación de cualquier garantía derivada de la adquisición de estos kits.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad indicada si se almacenan y manipulan según las instrucciones. No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- El estricto cumplimiento del protocolo garantiza un rendimiento y una reproducibilidad óptimos. Asegúrese de usar el programa adecuado del termociclador, ya que, si usa otros programas, los resultados serán imprecisos o erróneos y darán lugar a falsos positivos y falsos negativos.
- No mezcle ni combine reactivos de kits con diferentes números de lote.
- Utilice equipos de protección personal estándar, siga las prácticas óptimas de laboratorio y tome las precauciones necesarias cuando trabaje con muestras. Manipule las muestras en instalaciones aprobadas de contención de seguridad biológica y ábralas solo en campanas de seguridad biológica certificadas. Emplee agua para uso en biología molecular a la hora de preparar el ADN de la muestra.
- Dado que se trata de una prueba de sensibilidad analítica, debe ser extremadamente cauteloso para evitar la contaminación de los reactivos o mezclas de amplificación con muestras, controles o material amplificado. Todos los reactivos deben controlarse estrechamente para detectar signos de contaminación (*p. ej.*, controles negativos que den señales positivas). Elimine cualquier reactivo que pueda haberse contaminado.
- Para reducir al mínimo la contaminación, use guantes limpios cuando manipule muestras y reactivos y limpie de manera regular las zonas de trabajo y las pipetas antes de realizar la PCR.
- El autoclave no elimina la contaminación del ADN. En el laboratorio de PCR, siga una secuencia de trabajo unidireccional entre las distintas zonas de trabajo: comience con la preparación de mezclas de reacción, continúe con la preparación de las muestras, luego con la amplificación y, finalmente, con la detección. No lleve ADN amplificado a las zonas designadas para la preparación de mezclas de reacción o de muestras.
- Las pipetas, puntas de pipetas y cualquier otro instrumento utilizado en una zona específica del laboratorio deben ser de uso exclusivo de dicha zona.
- Siempre que sea posible, utilice material plástico estéril desechable para evitar la contaminación con RNasa y DNasa o la contaminación cruzada.

## 4.3. Conservación y manipulación

- Si no va a hacer un uso inmediato de los kits de ensayo, consérvelos a una temperatura de entre -85 °C v -65 °C.
- La temperatura de conservación óptima para los controles de ADN es de entre 2 °C y 8 °C, pero los controles de ADN pueden conservarse a largo plazo entre −85 °C y −65 °C.
- Todos los reactivos y controles deben descongelarse y mezclarse en un agitador vortex antes de usarse para garantizar su completa resuspensión. Una agitación vorticial excesiva puede dañar el ADN y hacer que los cebadores marcados pierdan sus fluoróforos.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad indicada si se almacenan y manipulan según las instrucciones. No utilice los kits después de su fecha de caducidad.
- Debido a las altas concentraciones de sal, las mezclas de reacción de PCR son sensibles a los ciclos de congelación/descongelación. Vierta las mezclas de reacción en tubos estériles con cierre roscado y junta tórica si es necesario.

# 5. Instrumental

### 5.1. Termociclador

- Uso o función: amplificación de muestras de ADN
- Características de rendimiento y especificación:
  - Intervalo térmico mínimo: entre 15°C y 96°C
  - Velocidad mínima de rampa: 0,8°C/s
- Siga los procedimientos de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante
- Consulte el apartado 7.4, *Amplificación*, para conocer el programa del termociclador

## 5.2. Unidad de electroforesis

- Uso o función: separación de fragmentos de ADN
- Características de rendimiento y especificación:
  - o Capacidad de funcionar de 35 V a 135 V durante un tiempo prolongado
- Siga los procedimientos de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante

## 5.3. Unidad de iluminación UV

- Uso o función: detección de ADN
- Características de rendimiento y especificación:
  - Capacidad de emitir luz a una longitud de onda de aprox. 302 nm
- Siga los procedimientos de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante

# 6. Recogida y preparación de las muestras

#### 6.1. Precauciones

Las muestras biológicas procedentes de seres humanos pueden contener materiales posiblemente infecciosos. Manipule las muestras de acuerdo con la norma de la OSHA sobre patógenos de transmisión hemática y de acuerdo con un nivel de bioseguridad 2.

## 6.2. Sustancias que pueden interferir

Las siguientes sustancias pueden interferir con la PCR:

- Quelantes de cationes divalentes
- Puntas de pipeta de baja retención
- EDTA (no significativo en concentraciones bajas)
- Heparina

## 6.3. Requisitos y manipulación de las muestras

Este ensayo analiza el **ADN genómico** (ADNg) de los siguientes orígenes:

- 5 cc de sangre periférica, biopsia de médula ósea o aspirado de médula ósea anticoagulado con heparina o EDTA (conservados a entre 2°C y 8°C y transportados a temperatura ambiente)
- 5 mm cúbicos como mínimo de tejido (conservado y enviado congelado o conservado y enviado en RPMI 1640 a temperatura ambiente o en hielo)
- 2 µg de ADN genómico (conservado a entre 2°C y 8°C y enviado a temperatura ambiente)
- Tejido o cortes fijados en formol e incluidos en parafina (conservados y enviados a temperatura ambiente)

# 6.4. Preparación de la muestra

Extraiga el ADN genómico de las muestras de los pacientes lo antes posible. Vuelva a suspender el ADN en concentraciones finales de entre 100 µg y 400 µg por mL en solución TE 1/10 (1 mM de Tris-HCl, pH 8,0 y 0,1 mM de EDTA) o en agua para uso en biología molecular o que reúna las condiciones de la USP. Este es un sistema de pruebas sólido. Los resultados válidos derivan de un amplio abanico de concentraciones de ADN. Por lo tanto, no suele ser necesario cuantificar y ajustar las concentraciones de ADN. Analizar el ADN de la muestra con Specimen Control Size Ladder Master Mix (Mezcla de reacción de control de la muestra con marcador de tamaño) garantizará que la calidad y la cantidad del ADN sean suficientes para que el resultado sea válido.

# 6.5. Conservación de la muestra

Conserve el ADNg de 2°C a 8°C o de -85°C a -65°C si la conservación se hará a largo plazo.

# 7. Procedimiento de ensayo

# 7.1. Materiales suministrados

Tabla 2: Componentes del kit

N.º de catálogo	Descripción
<b>REF</b> 21030010CE	<i>IGL</i> Tube – Unlabeled (Tubo de IGL – Sin marcar)
<b>REF</b> 20960020	Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (Control de la muestra con marcador de tamaño - Sin marcar)
REF 40880550	IVS-0010 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0010)
<b>REF</b> 40881690	IVS-0029 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0029)
<b>REF</b> 40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de control policlonal IVS-0000)

# 7.2. Materiales necesarios (no suministrados)

Tabla 3: Materiales necesarios (no suministrados)

Reactivo/material	Reactivo o material recomendado y proveedor	Número de catálogo	Notas
ADN polimerasa	Roche:  • DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq Invivoscribe, Inc.:  • DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq <sup>1</sup> o equivalente	05206944190 60970100	N. P.
Agua para uso en biología molecular o que reúna las condiciones de la USP desionizada y destilada en vidrio	N. P.	N. P.	Estéril y exenta de DNasa y RNasa.
Pipetas calibradas	Rainin:  • Pipetas P-2, P-20, P-200 y P-1000  • O pipetas SL-2, SL-20, SL-200 y SL-1000	N. P.	Deben ser capaces de medir con precisión volúmenes de entre 1 $\mu$ L y 1000 $\mu$ L.
Termociclador	Bio-Rad:  • MJ Research PTC-100 o PTC-200, PTC-220, PTC-240  Perkin-Elmer  • PE 9600 o PE 9700	N. P.	N. P.
Agitador vortex	N. P.	N. P.	N. P.
Placas o tubos para PCR	N. P.	N. P.	Estériles.
Puntas de pipeta con barrera de filtro	N. P.	N. P.	Estériles y exentas de RNasa, DNasa y pirógenos.
Tubos de microcentrífuga	N. P.	N. P.	Estériles.
Unidad de electroforesis en gel	N. P.	N. P.	Para geles de poliacrilamida.
Bromuro de etidio	Thermo Fisher Scientific:  ■ Bromuro de etidio UltraPure™ 10 mg/mL	15585-011	N. P.
Geles de poliacrilamida 6 %	Thermo Fisher Scientific:  • Geles Novex® TBE (6 %, 12 pocillos)	EC62652Box	N. P.
Tampón TBE de migración	Thermo Fisher Scientific:  • Tampón TBE de migración Novex (5X)	LC6675	Diluir a 1:5 antes del uso.

Tabla 3: Materiales necesarios (no suministrados)

Reactivo/material	Reactivo o material recomendado y proveedor	Número de catálogo	Notas
Tampón de carga de gel	<ul> <li>Thermo Fisher Scientific:</li> <li>Tampón de carga de gel 10X BlueJuice™</li> <li>Tampón TBE de muestra de alta densidad Novex (5X)</li> </ul>	10816-015 LC6678	N. P.
100 bp DNA Ladder (Marcador de ADN de 100 pb)	Thermo Fisher Scientific:  • 100 bp DNA Ladder (Marcador de ADN de 100 pb)  TrackIt™	10488-058	N. P.

**Nota:** Este producto está a la venta únicamente para su uso en el Espacio Económico Europeo. No debe revenderse ni transferirse a terceros. Consulte también el Aviso legal en el apartado 15.

## 7.3. Preparación de los reactivos

- Analice todas las muestras desconocidas usando Specimen Control Size Ladder Master Mix para garantizar la ausencia de inhibidores de la amplificación y la presencia de la cantidad y la calidad necesarias del ADN para generar un resultado válido.
- Los resultados de las pruebas realizadas una sola vez son válidos. No obstante, analice por duplicado siempre que sea posible. Si los análisis por duplicado arrojan resultados incoherentes, será necesario realizar un nuevo análisis o una nueva evaluación de la muestra.
- Analice los controles **positivos**, **negativos** y **blancos** de cada mezcla de reacción.
- 7.3.1. Use guantes para sacar las mezclas de reacción del congelador. Deje que los tubos se descongelen por completo. A continuación, mezcle con el agitador vortex.
- 7.3.2. Encienda la campana de extracción o la cabina para PCR y pipetee una parte de cada mezcla de reacción a los tubos para microcentrífuga, que deberán estar esterilizados y limpios.
  - Los volúmenes de las partes son de 45 μL para cada reacción.
  - Incluya un volumen de reacción adicional por cada 15 reacciones para corregir errores de pipeteo.
  - Para cada mezcla de reacción (excepto para Specimen Control Size Ladder Master Mix), el número de reacciones (n) es:

n = 2 × n.º de muestras	(analice las muestras por duplicado)
+ 1	ADN de control positivo (consulte el apartado 7.7, Controles positivos recomendados)
+ 1	ADN de control negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA
+ 1	Control blanco (agua)
+ 1	Para corregir errores de pipeteo

 $n = 2 \times n.^{\circ}$  de muestras + 4 Total

- Por lo tanto, el volumen total de la parte para cada mezcla de reacción es  $\mathbf{n} \times \mathbf{45} \, \mu \mathrm{L}$ .
- Para Specimen Control Size Ladder Master Mix, el número de reacciones (m) es:

m = n.º de muestras	(analice las muestras por duplicado)
+ 1	ADN de control positivo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	Control blanco (agua)
+ 1	Para corregir errores de pipeteo
	_

m = n.º de muestras + 3 Total

- Por lo tanto, el volumen total de la parte de Specimen Control Size Ladder Master Mix es  $\mathbf{m} \times \mathbf{45} \, \mu \mathbf{L}$ .
- 7.3.3. Añada 1,25 unidades (o 0,25 µL a 5 U/µL) de ADN Taq polimerasa por reacción a cada mezcla de reacción.
  - La ADN Taq polimerasa total pipeteada a cada mezcla maestra es  $\mathbf{n} \times \mathbf{0,25}~\mu\mathrm{L}$  y  $\mathbf{m} \times \mathbf{0,25}~\mu\mathrm{L}$  para la Specimen Control Size Ladder Master Mix.
  - Mezcle suavemente en el agitador vortex.
- 7.3.4. Por cada reacción, vierta 45 µL de la mezcla de reacción que corresponda + la solución de ADN polimerasa en los pocillos de una placa o un tubo para PCR.
- 7.3.5. Añada 5 µL del molde que corresponda (ADN de muestra, ADN de control positivo, ADN de control negativo o agua) a los pocillos individuales que contengan las mezclas de reacción respectivas.
  - Pipetee arriba y abajo varias veces para mezclar.

### 7.3.6. Tape o cubra la placa para PCR.

- Las muestras estarán listas para su amplificación en un termociclador.
- Si la amplificación no puede realizarse inmediatamente después de la preparación de los reactivos, las placas o tubos para PCR pueden conservarse a entre 2°C y 8°C durante 24 horas como máximo.

#### Guía rápida:

Por cada mezcla de reacción y **n** de reacciones, mezcle:

 ${f n} imes 45~\mu L$  Mezcla de reacción  ${f n} imes 0,25~\mu L$  ADN Taq polimerasa

Mezcle suavemente en el agitador vortex.

Pipetee  $45~\mu L$  de la mezcla de reacción + la solución de ADN polimerasa en cada pocillo de reacción

Añada 5 μL del molde que corresponda en cada pocillo

Volumen total de la reacción = 50 μL

## 7.4. Amplificación

- 7.4.1. Amplifique las muestras mediante el siguiente programa de PCR:
  - Seleccione la opción de medición de la temperatura indicada en el termociclador BioRad MJ Research PTC.

Tabla 4: Condiciones del termociclador

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
1	95°C	7 minutos	1
2	95°C	45 segundos	
3	60°C	45 segundos	35
4	72°C	90 segundos	
5	72°C	10 minutos	1
6	15°C	∞	1

- 7.4.2. Extraiga la placa o los tubos de amplificación del termociclador.
  - Aunque el ADN amplificado sea estable a temperatura ambiente durante largos períodos, conserve los productos de PCR a entre 2°C y 8°C hasta la detección.
  - La detección debe realizarse en los 30 días posteriores a la amplificación.

### 7.5. Detección en gel – Análisis de heterodúplex

- No analice los heterodúplex de los productos de la PCR de la Specimen Control Size Ladder Master Mix. Omita los pasos 7.5.1 7.5.2 y continúe con el paso 7.5.3.
- 7.5.1. Desnaturalice 20 µL de los productos de PCR a 94°C durante 5 minutos.
- 7.5.2. Enfríe rápidamente para rehibridar los productos de PCR a 4°C (en un baño de agua con hielo) durante 60 minutos.
- 7.5.3. Monte la unidad de electroforesis usando un gel TBE de poliacrilamida al 6 % no desnaturalizante y un tampón de migración TBE 1X.
- 7.5.4. Mezcle 20  $\mu$ L de cada muestra con 5  $\mu$ L de tampón de carga de azul de bromofenol 5X no desnaturalizante enfriado con hielo.
- 7.5.5. Cargue los 20 µL de la mezcla en pocillos individuales del gel.
- 7.5.6. Procese el gel a 110 V durante 2-3 horas o a 40-50 V durante la noche.
  - El voltaje y el tiempo de la electroforesis dependen del tamaño del amplicón de PCR y del espesor del gel de poliacrilamida.
  - El voltaje y el tiempo de funcionamiento se pueden adaptar en consecuencia.
- 7.5.7. Tiña los geles en 0,5 µg/mL de bromuro de etidio (en agua o tampón TBE 0,5X) de 5 a 10 minutos.
- 7.5.8. Destiña los geles en agua entre 5 y 10 minutos. Repita con agua limpia.
- 7.5.9. Coloque el gel sobre el iluminador UV para ver las bandas.
- 7.5.10. Fotografíe e interprete los datos resultantes. Consulte los apartados 8, *Interpretación de los resultados*, y 10, *Valores previstos*.

### 7.6. Control de calidad

Con el kit se suministran controles positivos y negativos (o normales); estos se pueden procesar una sola vez cada vez que se realiza la prueba, a fin de garantizar un rendimiento adecuado. Además, incluye un control blanco (p. ej., agua) para saber si la mezcla de reacción se ha contaminado y si existe contaminación cruzada en las reacciones. También se puede agregar un control de tampón para garantizar que el tampón usado para resuspender las muestras no se haya contaminado. Los valores de los controles positivos figuran en el apartado 10.1, *Tamaño previsto de los productos amplificados*. Invivoscribe ofrece controles adicionales y controles de sensibilidad (diluciones de controles positivos en el control negativo).

## 7.7. Controles positivos recomendados

Los tamaños del amplicón indicados se determinaron utilizando una plataforma ABI.

Tabla 5: Controles positivos recomendados

Mezcla de reacción	Diana	ADN de control	N.º de catálogo	Tamaño del producto en pares de bases (pb)
<i>IGL</i> Tube	Vλ - Jλ	Intervalo de tamaño válido IVS-0010 Clonal Control DNA IVS-0029 Clonal Control DNA	40880550 40881690	<b>135 - 170</b> 139 143, 156
Specimen Control Size Ladder	Varios genes	Intervalo de tamaño válido IVS-0000 Polyclonal Control DNA	 40920010	<b>100, 200, 300, 400, 600</b> <sup>a</sup> 100, 200, 300, 400, 600 <sup>a</sup>

Nota: Dado que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 600 pb presente una menor señal o esté completamente ausente.

# 8. Interpretación de los resultados

A pesar de que un resultado positivo podría ser indicativo de neoplasia maligna, interprete los resultados tanto positivos como negativos teniendo en cuenta los datos clínicos y los resultados de los análisis. El intervalo de tamaños de cada mezcla maestra se ha determinado mediante el análisis de las muestras de control positivo y negativo. Para que la interpretación sea precisa y significativa, deben descartarse los picos que no se ajusten al intervalo de tamaños válido para cada una de las mezclas de reacción.

#### 8.1. Análisis

- 8.1.1. Indique lo siguiente para las muestras que no consiga amplificar tras repetir el análisis: "Se desconoce la naturaleza de la muestra porque la cantidad o la calidad del ADN eran insuficientes para su análisis".
- 8.1.2. Repita el análisis de las muestras que den negativo si falló la reacción del control positivo.
- 8.1.3. Si las muestras procesadas por duplicado arrojan resultados incompatibles, vuelva a analizar o a evaluar las muestras por si se han cambiado.
- 8.1.4. Todos los controles deben examinarse antes de interpretar los resultados de las muestras. Si los controles no arrojan resultados correctos, la prueba no es válida, por lo que no pueden interpretarse las muestras.

Tabla 6: A continuación se describe el análisis de cada uno de los controles, así como las decisiones que deben tomarse en función de los resultados.

Tipo de control	Resultado previsto	Resultado anómalo
Control blanco	Ausencia de amplificación: continúe con el análisis.	Presencia de amplificación: repita el ensayo.
Control policional	El tamaño de producto es coherente con el tamaño previsto en el apartado 10.1, <i>Tamaño previsto de los productos amplificados</i> . Ausencia de reordenamientos clonales. Continúe con el análisis.	Presencia de reordenamientos clonales. Repita la prueba.
Control positivo (también puede usarse un control de extracción si el material de control positivo abarca procesos de extracción)	El tamaño de producto es coherente con el tamaño previsto en el apartado 10.1, <i>Tamaño</i> previsto de los productos amplificados. Continúe con el análisis.	Repita el ensayo.
Specimen Control Size Ladder (Control de la muestra con marcador de tamaño) (este control de amplificación es <u>esencial</u> para muestras cuya cantidad y calidad se desconoce)	Si se observan picos de 100, 200, 300, 400 y 600 pb, continúe con el análisis.  Debido a que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 600 pb tenga una menor señal o que esté completamente ausente.  Continúe con el análisis.	Si no se observan bandas, repita el ensayo, a menos que la muestra arroje un resultado positivo. Si solo se observan 1, 2 o 3 bandas, vuelva a evaluar la muestra para comprobar la presencia de degradación del ADN, a menos que la muestra arroje un resultado positivo.

## 8.2. Interpretación de las muestras

Si los controles arrojan los resultados previstos, interprete las muestras clínicas del siguiente modo:

- 8.2.1. Si se observan una o dos bandas positivas<sup>a</sup> que se ajustan al intervalo de tamaño válido, debe notificarse lo siguiente:
  - "Positivo para la detección de reordenamientos genéticos de la cadena ligera lambda de la inmunoglobulina coherentes con la presencia de una población de células clonales. De acuerdo con los criterios diagnósticos generales, las poblaciones de células clonales pueden indicar la presencia de neoplasias hemáticas".
- 8.2.2. Si no se observan bandas positivas<sup>a</sup> que se ajusten al intervalo de tamaño válido, debe notificarse lo siguiente:
  - "Negativo para la detección de reordenamientos genéticos de la cadena ligera lambda de la inmunoglobulina".

<sup>a</sup>Nota: Los criterios para definir una banda positiva son los siguientes:

 Los productos generados a partir de muestras que se encuentran dentro del intervalo de tamaño válido y producen una(s) banda(s) discreta(s) distinguible(s) de cualquier extensión del fondo son coherentes con una banda positiva.

# 9. Limitaciones del procedimiento

- Este ensayo no identifica el 100 % de las poblaciones de células clonales.
- El ensayo no puede detectar de manera fiable menos de cinco (5) células positivas por cada 100 células normales.
- Los resultados de las pruebas de clonalidad molecular siempre deben interpretarse en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.
- Las pruebas de tipo PCR están sujetas a interferencia por degradación del ADN o inhibición de la PCR por EDTA, heparina y otros compuestos.

# 10. Valores previstos

## 10.1. Tamaño previsto de los productos amplificados

Los tamaños del amplicón indicados se determinaron utilizando una plataforma ABI.

Tabla 7: Tamaños previstos de los productos amplificados

Mezcla de reacción	Diana	ADN de control	N.º de catálogo	Tamaño del producto en pares de bases (pb)
<i>IGL</i> Tube	Vλ - Jλ	Intervalo de tamaño válido IVS-0010 Clonal Control DNA IVS-0029 Clonal Control DNA	40880550 40881690	<b>135 - 170</b> 139 143, 156
Specimen Control Size Ladder	Varios genes	Intervalo de tamaño válido IVS-0000 Polyclonal Control DNA	 40920010	<b>100, 200, 300, 400, 600</b> <sup>a</sup> 100, 200, 300, 400, 600 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Nota: Dado que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 600 pb presente una menor señal o esté completamente ausente.

## 10.2. Datos de la muestra

Los datos que se muestran abajo se generaron utilizando la mezcla de reacción indicada. Los productos amplificados fueron heteroduplexados y procesados en gel de poliacrilamida al 6 %.

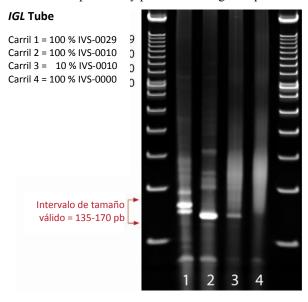


Figura 2. Mezcla de reacción del IGL Tube (Tubo de IGL).

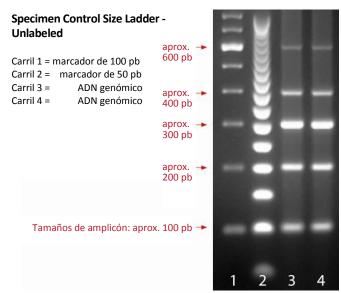


Figure 3. Specimen Control Size Ladder Master Mix

# 11. Características de rendimiento

IdentiClone *IGL* Gene Clonality es una prueba por PCR rápida y fiable, mucho más sensible que la técnica de Southern (SB) para la detección de clonalidad en casos de sospecha de neoplasias linfoproliferativas. El diagnóstico clínico e histopatológico final se correlaciona bien con los resultados de la PCR en un gran número de pacientes frente a los resultados de la técnica de SB.<sup>2</sup>

Tabla 8. Estudios de concordancia

	Concordancia PCR-SB:2
IGH.	sensibilidad del 93 % y especificidad del 92 %
IGK:	sensibilidad del 90 % y especificidad del 90 %
IGL:	sensibilidad del 86 % y especificidad del 92 %
TCRB:	sensibilidad del 86 % y especificidad del 98 %
TCRG:	sensibilidad del 89 % y especificidad del 94 %
TCRD.	sensibilidad del 83 % y especificidad del 95 %

La precisión diagnóstica determinada de este ensayo IdentiClone es al menos del 89 %. No se generaron falsos positivos claros con los ensayos IdentiClone y se logró un elevado grado de precisión. En consecuencia, un beneficio claro de este ensayo es que los resultados generados para la clonalidad permiten la posterior detección de reordenamientos de genes específicos del paciente y del tumor para la detección de una enfermedad residual mínima.

# 12. Bibliografía

- 1. Miller, J. E.; Wilson, S. S.; Jaye, D. J.; Kronenberg, M.: An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Mol. Diag.* 1999, **4(2)**:101-117.
- 2. Van Dongen, J. J. M. *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.

# 13. Servicio técnico y atención al cliente

Los representantes del servicio técnico y de atención al cliente están disponibles de lunes a viernes para responder a sus preguntas por teléfono, correo electrónico o web.

### Datos de contacto

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

Teléfono: +1 858 224-6600
Fax: +1 858 224-6601
Servicio técnico: support@invivoscribe.com
Atención al cliente: sales@invivoscribe.com
Sitio web: www.invivoscribe.com
Horario comercial: De 07:00 a 17:00 PST/PDT

# Representante autorizado y asistencia técnica en la UE

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

Teléfono: +33 (0)4 42 01 78 10
Fax: +33 (0)4 88 56 22 89
Servicio técnico: support@invivoscribe.com
Atención al cliente: sales-eu@invivoscribe.com
Sitio web: www.invivoscribe.com
Horario comercial: De 9:00 a 17:00 CET/CEST

# 14. Símbolos

Los siguientes símbolos figuran en el etiquetado de los productos de diagnóstico de Invivoscribe.

Para uso diagnóstico in vitro

REF

Número de catálogo

VOL

Volumen de reactivo

Número de lote

Consulte las instrucciones de uso

Condiciones de conservación

# 15. Aviso legal

## 15.1. Garantía y responsabilidad

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) se compromete a suministrar productos de primera calidad. Invivoscribe® garantiza que sus productos cumplen e incluso superan los criterios de rendimiento descritos en las Instrucciones de uso por lo que respecta a los productos cubiertos. Si alguno de los productos no funciona de acuerdo con las especificaciones indicadas para el producto en cuestión, nuestra política es reemplazar el producto o abonar el precio total de compra. Invivoscribe® no ofrece ninguna otra garantía, explícita o implícita. La responsabilidad de Invivoscribe® se limita al precio de compra del producto. Invivoscribe no se responsabilizará de daños directos, indirectos, consecuentes o accidentales derivados del uso, los resultados del uso o la imposibilidad de usar sus productos. Debe establecerse y controlarse continuamente la eficacia del producto en condiciones controladas por el comprador y en su laboratorio a través de procesos definidos y controlados por el comprador, entre los que se incluyen las pruebas con controles positivos, negativos y blancos cada vez que se analiza una muestra. El pedido, la aceptación y el uso del producto constituyen la aceptación por parte del comprador de la responsabilidad exclusiva de garantizar la eficacia del producto y el acuerdo del comprador con la limitación de responsabilidad.

Este es un producto de diagnóstico in vitro que no está disponible para su venta o uso en Norteamérica.

### 15.2. Patentes y marcas registradas

Este producto está cubierto por una o más de las siguientes: patente europea número 1549764, patente europea número 2418287, patente europea número 2460889, patente japonesa número 4708029, patente estadounidense número 8859748, y solicitudes pendientes y futuras relacionadas. Todas estas patentes y solicitudes se limitan únicamente a Invivoscribe®. También son aplicables patentes adicionales cuyo uso se ha autorizado a Invivoscribe. Muchos de estos productos implican el uso de métodos de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante la compra de este producto no se transmite de manera explícita ni implícita ninguna de las licencias de uso de estas patentes sobre enzimas o procesos de amplificación.

IdentiClone® es una marca comercial registrada de Invivoscribe®.

© 2021 Invivoscribe, Inc. Todos los derechos reservados. Las marcas comerciales que figuran en este documento son propiedad de Invivoscribe, Inc., de sus filiales o, en el caso de las marcas comerciales de terceros, de sus respectivos propietarios.

### 15.3. Aviso para el comprador: SOLO para DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq

Este producto está a la venta únicamente para su uso en investigación en el Espacio Económico Europeo (EEE). No debe revenderse ni transferirse a terceros. El uso de este producto está cubierto por la patente estadounidense número 6127155 y las solicitudes de patentes pertinentes de fuera de los Estados Unidos. El comprador del producto puede usar únicamente la cantidad de producto necesaria para realizar investigaciones de carácter interno. No se otorgan de forma explícita derechos relacionados con otras solicitudes de patente ni derechos a prestar servicios comerciales de ningún tipo, entre los que se incluyen la notificación de resultados de las actividades del comprador a cambio de honorarios u otra consideración comercial. Este producto es solo para uso en investigación. De acuerdo con Roche, los usos para el diagnóstico en humanos y animales requieren una licencia específica de Roche. Todos los usos distintos de las investigaciones de carácter interno y los usos para diagnóstico en humanos y animales relacionados con la patente de Roche requieren una licencia específica de Thermo Fisher Scientific. Al usar este producto, reconoce su aceptación de lo anterior. Para saber más sobre la compra de licencias de Roche, póngase en contacto con el Departamento de Licencias de Roche Molecular Systems, Inc., 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, California 94588 (Estados Unidos) o con Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim (Alemania). Para saber más sobre la compra de licencias de Thermo Fisher Scientific, póngase en contacto con el Departamento de Licencias de Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008 (Estados Unidos).