

Instrucciones para su Uso



IdentiClone® *TCRB* Gene Clonality Assay

Para la Identificación de Reordenamientos Clonales de Genes Codificantes para la Cadena Beta del Receptor de la Célula T.

IVD Para Diagnóstico *In Vitro*



 Conditions de Conservation: **-85°C to -65°C**
(Los controles de ADN pueden separarse del resto de los materiales del ensayo y mantenerse a una temperatura entre 2°C y 8°C)

Nro. de Catálogo	Productos	Cantidad
REF 92050011	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reacciones
REF 92050021	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reacciones

Contenidos

1.	USO PREVISTO	3
2.	RESUMEN Y DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO	3
3.	PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO.....	4
3.1.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	4
3.2.	Detección de Fluorescencia Diferencial	4
4.	REACTIVOS	5
4.1.	Componentes	5
4.2.	Precauciones y Advertencias	6
4.3.	Almacenamiento y Manipulación	6
5.	INSTRUMENTOS.....	7
5.1.	Termociclador.....	7
5.2.	Los Instrumentos de ABI por Electroforesis Capilar	7
6.	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	8
6.1.	Precauciones.....	8
6.2.	Sustancias que Interfieren	8
6.3.	Requisitos de la Muestra y su Manipulación	8
6.4.	Preparación de la Muestra.....	8
6.5.	Conservación de la Muestra	8
7.	PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.....	9
7.1.	Materiales Suministrados en el Kit	9
7.2.	Materiales Requeridos pero No Suministrados en el Kit.....	9
7.3.	Preparación de los Reactivos	10
7.4.	Amplificación	11
7.5.	Detección de Fluorescencia ABI	12
7.6.	Control de Calidad	12
7.7.	Controles Positivos Recomendados	13
8.	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	13
8.1.	Análisis	13
8.2.	Interpretación de la Muestra Problema.....	14
9.	LIMITACIONES DEL ENSAYO	14
10.	VALORES ESPERADOS.....	15
10.1.	Tamaño Esperado de los Productos Amplificados.....	15
10.2.	Resultados de la Muestra.....	15
11.	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	17
12.	SERVICIO TÉCNICO Y AL CLIENTE	18
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	18
14.	SIMBOLGÍA UTILIZADA.....	18
15.	ASPECTOS LEGALES	19
15.1.	Garantía y responsabilidad	19
15.2.	Patentes y Marcas Registradas	19

1. Uso Previsto

El IdentiClone *TCRB* Gene Clonality Assay, es una prueba diagnóstica *in vitro* basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), diseñada para la identificación de reordenamientos clonales de genes codificantes para la cadena beta del receptor de la célula T en pacientes con sospechas de enfermedades linfoproliferativas. Específicamente, el *TCRB* Gene Clonality Assay puede utilizarse con los siguientes fines:

- Identificar clonalidad en enfermedades linfoproliferativas atípicas
- Sustentar un diagnóstico diferencial entre lesiones reactivas y neoplasias de células T y/o de algunas neoplasias de células B inmaduras
- Determinar el linaje celular involucrado en enfermedades linfoproliferativas diferenciadas
- Monitorizar y evaluar recurrencias de la enfermedad

2. Resumen y descripción del ensayo

Los reordenamientos de los genes que codifican los receptores antigénicos ocurren durante la ontogenia de los linfocitos T y B. Dichos reordenamientos genéticos generan productos que son únicos tanto en longitud como en secuencia genética para cada célula. Por lo tanto, los ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden utilizar para identificar poblaciones de linfocitos que derivan de una única célula mediante la detección del reordenamiento específico de los genes V-J, presente dentro del locus del receptor antigénico.¹ El ensayo de PCR IdentiClone emplea múltiples oligonucleótidos iniciadores (cebadores) consenso que hibridan regiones genéticas conservadas dentro del gen codificante para la cadena beta del receptor de la célula T. Este ensayo se utiliza para la detección de una gran mayoría de neoplasias clonales de linfocitos T a partir de ADN. Los productos resultantes de la amplificación se pueden analizar mediante el uso de diferentes métodos de detección entre los que se incluyen la electroforesis en geles y la electroforesis capilar.

El análisis de los reordenamientos genéticos también se puede realizar mediante técnicas basadas en Southern Blot (SB). Aunque el análisis mediante SB es muy fiable, está siendo reemplazado cada vez más por las técnicas de PCR debido a la mayor eficiencia y sensibilidad de estas últimas. Más aún, las técnicas de PCR son relativamente fáciles, menos laboriosas y requieren mucha menos cantidad de ADN de alto peso molecular que los ensayos de SB. Por otro lado, a menudo la PCR puede ser realizada en ADN extraído de muestras de tejido fijado y embebido en parafina, mientras que no ocurre lo mismo para SB, ya que con frecuencia el ADN en estas muestras está degradado. Debido a todo lo anterior, existe una gran necesidad de reemplazar el análisis mediante SB por técnicas fiables de PCR.

El ensayo IdentiClone de Invivoscribe representa una nueva propuesta para la determinación diagnóstica de clonalidad basada en la PCR. Estos ensayos estandarizados fueron rigurosamente optimizados analizando muestras controles positivas y negativas empleando múltiples *master mixes* (mezclas de reacción). El desarrollo del ensayo fue seguido por un extenso proceso de validación que incluía la determinación analítica de más de 400 muestras clínicas clasificadas según la Clasificación Revisada Europea/Americana de Linfomas (REAL). Las determinaciones fueron hechas en más de 30 centros de diagnóstico destacados e independientes diseminados a través de toda Europa en el marco de un estudio de colaboración conocido como la Acción Concertada BIOMED-2. Los resultados del estudio BIOMED-2 se encuentran publicados en *Leukemia*, una revista especializada líder en el área.²

Los ensayos basados en la detección con fluorescencia ABI no son capaces de detectar de manera fiable poblaciones clonales que representen menos del 1% de la población total de linfocitos. Debe enfatizarse que los resultados de los ensayos moleculares de clonalidad deben interpretarse siempre en un contexto conjunto de datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos.

El presente ensayo incluye 4 mezclas de reacción. Los Tubos *TCRB* A y B (*TCRB* Tubes A y B) hibridan en las regiones de entramado dentro de la región variable y de la región de unión del locus de la cadena beta del *TCR*. El Tubo *TCRB* C (*TCRB* Tube C) hibrida en las regiones de diversidad y unión. Finalmente, la mezcla de reacción Specimen Control Size Ladder (control de muestra con marcador de tamaño) hibrida con varios genes amplificando una serie de productos de 96, 197, 297, 397 y 602 pares de bases para asegurar que la calidad y cantidad de ADN inicial es la adecuada para generar un resultado válido. En todos nuestros ensayos de clonalidad se utiliza un único programa de termociclador y metodologías de detección similares con lo que se mejora la consistencia interna y facilita el entrenamiento en una gama amplia de ensayos diferentes.

Este ensayo se basa en la acción concertada EuroClonality/BIOMED-2 BMH4-CT98-3936.



3. Principios del Procedimiento

3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los ensayos de PCR son utilizados de manera rutinaria para la identificación de poblaciones clonales de células T. Estos ensayos amplifican el ADN situado entre los cebadores que hibridan en las secuencias conservadas (FR) de las regiones variables (V) y en las regiones conservadas de unión (J) (*TCRB* Tubes A & B), así como el que se encuentra entre las regiones de diversidad (D) y de unión (*TCRB* Tube C). Estas regiones conservadas se encuentran a ambos lados en un área dentro de la región V-J donde se llevan a cabo los reordenamientos genéticos programados durante la maduración de los linfocitos B y T. Los genes de receptores antigénicos que sufren reordenamientos son aquellos genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras en las células B, y los genes que codifican para el receptor de células T en las células T. Cada célula B o T tiene un único reordenamiento V-J productivo con una longitud y secuencia nucleotídica característica. Por lo tanto, cuando el ADN de una población normal o policlonal se amplifica utilizando cebadores que flanquean las regiones V-J, los productos generados forman una distribución normal o Gaussiana dentro de un rango de tamaños determinado. Esta distribución Gaussiana refleja la población heterogénea de reordenamientos V-J. (En ciertos casos, cuando el ADN de linfocitos no está presente, no se observa producto alguno). La amplificación del ADN de muestras que contienen una población clonal, genera uno o dos productos de amplificación prominentes (amplicones mayoritarios) dentro de un espectro minoritario de productos de amplificación policlonales de fondo.



Tube A: 23 Vβ primers + 6 Jβ1 primers and 3 Jβ2 primers

Tube B: 23 Vβ primers + 4 Jβ2 primers

Tube C: 2 Dβ primers + 13 Jβ primers



Figura 1. Representación simple de la organización de un gen reordenado que codifica para la cadena beta del receptor de la célula T presente en el cromosoma 7 (7q35), mostrando la ubicación aproximada de los oligonucleótidos cebadores sentido y antisentido. El número de los oligonucleótidos cebadores y su especificidad se encuentran listados para cada mezcla de reacción de los Tubos A, B, y C.

Debido a que los genes codificantes para el receptor antigénico son polimórficos (consisten en una población heterogénea de secuencias de ADN relacionadas) es difícil emplear un único conjunto de cebadores que hibriden en todas las regiones flanqueantes conservadas del reordenamiento V-J. Adicionalmente, la diversidad de la región N y las mutaciones somáticas, confieren aún más heterogeneidad a las secuencias de ADN de estas regiones. Por lo tanto, y para identificar la mayoría de los reordenamientos clonales posibles, es necesario emplear mezclas de reacción con varios cebadores que hibriden en varias regiones FR. Como se ha mencionado anteriormente, los reordenamientos clonales son identificados como productos prominentes de un tamaño concreto dentro de un fondo de productos minoritarios de tamaños diferentes que conforman una distribución Gaussiana alrededor de un reordenamiento de un tamaño promedio favorecido estadísticamente.

3.2. Detección de Fluorescencia Diferencial

La detección de fluorescencia diferencial normalmente se utiliza para resolver los amplicones de diferentes tamaños utilizando un instrumento de electroforesis capilar. Los cebadores pueden ser marcados con diferentes moléculas fluorescentes (fluoróforos) de manera que puedan producir diferentes espectros de emisión tras la excitación por un láser en el instrumento de electroforesis capilar. De esta manera, marcadores fluorescentes diferentes pueden corresponderse con diferentes regiones amplificadas. Este sistema de detección proporciona una sensibilidad insuperada, una resolución capaz de discriminar diferencias de sólo un nucleótido, una detección diferencial de los productos y una cuantificación relativa. Con este sistema además, se evita el uso de geles de agarosa y poliácridamida, así como de agentes carcinógenos como el bromuro de etidio. Más aún, la detección diferencial permite una interpretación exacta, reproducible y objetiva de los productos de amplificación específicos y el almacenamiento automático de los datos. La reproducibilidad intra- e inter-ensayo en la determinación del tamaño utilizando electroforesis capilar es de aproximadamente 1 a 2 nucleótidos. Esta reproducibilidad y sensibilidad junto con el archivo automático de los datos de las muestras posibilita el monitoreo, el seguimiento y la comparación de los datos de un determinado paciente a lo largo del tiempo.

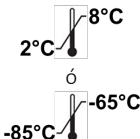
4. Reactivos

4.1. Componentes

Tabla 1. Kits Disponibles

Número de Catálogo	Producto	Cantidad
 92050011	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reactions
 92050021	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reactions

Tabla 2. Componentes

Reactivo	Número de Catálogo	Componentes del reactivo (ingredientes activos)	Cantidad	92050011 Nro. de unidades	92050021 Nro. de unidades	T° de Conservación
Mezclas de Reacción (Master Mixes)	22050011CE	<i>TCRB</i> Tube A – 6FAM & HEX Múltiples oligonucleótidos que hibridan en las regiones de entramado Vβ + Jβ1 + Jβ2 del gen de la cadena beta del receptor de la célula T en solución salina tamponada.	1500 µL	1	10	
	22050021CE	<i>TCRB</i> Tube B – 6FAM Múltiples oligonucleótidos que hibridan en las regiones de entramado Vβ + Jβ2 del gen de la cadena beta del receptor de la célula T en solución salina tamponada.	1500 µL	1	10	
	22050031CE	<i>TCRB</i> Tube C – 6FAM & HEX Múltiples oligonucleótidos que hibridan en las regiones de entramado Dβ + Jβ1 + Jβ2 del gen de la cadena beta del receptor de la célula T en solución salina tamponada.	1500 µL	1	10	
Mezcla Control de Amplificación de la Muestra	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM Múltiples oligonucleótidos que hibridan en diferentes genes endógenos.	1500 µL	1	10	
Controles Positivos de ADN	40880490	IVS-0009 Clonal Control DNA 200 µg/mL de ADN en solución TE 1/10	100 µL	1	5	
	40880190	IVS-0004 Clonal Control DNA 200 µg/mL de ADN en solución TE 1/10	100 µL	1	5	
	40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA 200 µg/mL de ADN en solución TE 1/10	100 µL	1	5	
Control Negativo (Normal) de ADN	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA 200 µg/mL de ADN en solución TE 1/10	100 µL	1	5	

Nota: No se ha utilizado conservante alguno en la fabricación de este producto.

4.2. Precauciones y Advertencias

- **IVD** Este producto es para Uso en Diagnóstico *In Vitro*
- El kit de ensayo será usado como un conjunto. Ningún reactivo debe sustituirse por otro reactivo similar proveniente de otro fabricante. El realizar diluciones, reducir los volúmenes de las mezclas de amplificación o cualquier otra desviación del protocolo original pueden afectar la eficacia de este ensayo y/o anular cualquier sublicencia limitada que se adquiera con la compra de este ensayo.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta cuando son manipulados, conservados y almacenados de acuerdo a las instrucciones. No utilizar los productos una vez sobrepasada la fecha de caducidad
- El cumplimiento riguroso de las instrucciones de uso y el seguimiento del protocolo asegurará un funcionamiento analítico y reproducibilidad óptimos. Debe asegurarse de que el programa del termociclador usado sea el correcto, ya que el uso de otros programas puede dar lugar a datos erróneos o inexactos, como resultados falsos positivos y falsos negativos.
- No mezclar o combinar los reactivos procedentes de kits con diferentes números de lote.
- Se recuerda al personal del laboratorio que deben usar todos los equipos de protección personal adecuados y trabajar de acuerdo a las buenas prácticas de laboratorio y a las recomendaciones universales para el trabajo con muestras biológicas. Las muestras deben ser manipuladas en instalaciones homologadas de contención de seguridad biológica y abiertas solamente en cabinas de seguridad biológica certificadas. Se recomienda el uso de agua destilada de grado biología molecular en la preparación del ADN de la muestra.
- Debido a la sensibilidad analítica de este ensayo, se debe tener un cuidado extremo para prevenir la contaminación de los reactivos o de las mezclas de amplificación con las muestras, controles o materiales amplificados. Todos los reactivos deben ser cuidadosamente examinados para detectar cualquier signo de contaminación (por ej. Controles negativos que generen señales positivas). Se debe descartar inmediatamente cualquier reactivo con sospecha de contaminación.
- Para minimizar las posibilidades de contaminación, se deben utilizar guantes limpios cuando se manipulen las muestras y los reactivos. Las áreas de trabajo y las pipetas se deben limpiar de forma rutinaria antes de empezar a realizar cualquier reacción de PCR.
- El proceso de esterilización en autoclave no elimina la contaminación con ADN. El flujo de trabajo en el laboratorio de PCR debe ir siempre en una sola dirección entre las diferentes áreas de trabajo separadas; comenzando en el área de Preparación de las Mezclas de Reacción; siguiendo en el de la Preparación de la Muestra, pasando a continuación al de la Amplificación, y finalmente al de la Detección. No introducir ADN amplificado en las áreas designadas para la preparación de la muestra o de las mezclas de reacción.
- Todas las pipetas, puntas y cualquier otro equipamiento utilizado en un área particular debe ser utilizado y mantenido dentro de esa área del laboratorio.
- Con el objetivo de prevenir la contaminación cruzada, y/o con RNasas y DNasas, siempre que sea posible, se debe utilizar material plástico estéril y desechable.

4.3. Almacenamiento y Manipulación

- Si el producto no es usado de forma inmediata, **el kit debe ser almacenado entre -85°C y -65°C.**
- La temperatura de almacenamiento óptima para los controles de ADN es entre 2°C y 8°C, aunque también pueden ser almacenados entre -85°C y -65°C.
- Todos los reactivos y controles deben ser descongelados y agitados vigorosamente antes de usarse para asegurar que se han resuspendido completamente. La agitación excesiva puede causar roturas en el ADN y la separación de los cebadores de sus fluoróforos conjugados.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad indicada cuando son manipulados y almacenados de acuerdo a las instrucciones. No deben utilizarse pasada su fecha de caducidad.
- Debido a su alta concentración salina, las mezclas de reacción de PCR son sensibles a los ciclos de congelado/descongelado. En caso necesario, las mezclas de reacción se deben alicuotar en tubos estériles y herméticos, con tapa de rosca y junta de goma.

5. Instrumentos

5.1. Termociclador

- Uso ó Función: Amplificación de muestras de ADN
- Instrumento sugerido: Veriti™ Thermal Cycler or equivalent
- Especificaciones y Características de Funcionamiento:
 - Rango Térmico Mínimo: de 15°C a 96°C
 - Velocidad Mínima de la Rampa: 0.8°C/seg
- Seguir los protocolos de instalación, operación, calibración y mantenimiento del fabricante.
- Ver la sección 7.4 *Amplificación* para el programa del termociclador.

5.2. Los Instrumentos de ABI por Electroforesis Capilar

- Uso ó Función: Detección de los fragmentos y análisis
- Especificaciones y Características de Funcionamiento:
 - Los siguientes instrumentos de electroforesis capilar cumplen con los requisitos de funcionamiento para este ensayo:
 - ABI 310 Genetic Analyzer (1-capilar)
 - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4-capilares)
 - ABI 3100 Genetic Analyzer (16-capilares)
 - ABI 3130 Genetic Analyzer (4-capilares)
 - ABI 3130xL Genetic Analyzer (16-capilares)
 - ABI 3500 Genetic Analyzer (8-capilares)
 - ABI 3500xL Genetic Analyzer (24-capilares)
- Seguir los protocolos de instalación, operación, calibración y mantenimiento del fabricante.
- El instrumento ABI utilizado debe estar calibrado con el grupo de fluoróforos 6FAM, HEX, NED, y ROX como se describe en 7.2 *Materiales Requeridos pero No Suministrados en el Kit*.
- Emplear las condiciones asignadas por defecto para el polímero y tipo de capilar utilizado.
- Ver la sección 7.5 *Detección de Fluorescencia* para la preparación de la muestra.

6. Recogida y Preparación de la Muestra

6.1. Precauciones

Las muestras biológicas humanas pueden contener materiales potencialmente infecciosos. Todas las muestras deben manipularse de acuerdo con las normas estándar OSHA sobre patógenos de transmisión sanguínea o las normas de bioseguridad de nivel 2.

6.2. Sustancias que Interfieren

Se sabe que las siguientes sustancias interfieren en la reacción de PCR:

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

6.3. Requisitos de la Muestra y su Manipulación

Este ensayo analiza **ADN genómico** proveniente de las siguientes fuentes:

- 5 mL de sangre periférica, biopsia de médula ósea, o aspirado de médula ósea anticoagulado con heparina o EDTA (conservado entre 2°C y 8°C y transportado a temperatura ambiente)
- Un mínimo de 5 mm cuadrados (5mm³) de tejido (conservado y transportado congelado; o conservado y transportado en RPMI 1640 a temperatura ambiente o en hielo)
- 2 µg de ADN genómico (conservado entre 2°C y 8°C y transportado a temperatura ambiente)
- Muestras o cortes de tejido fijados en formol y embebidos en parafina (conservados y transportados a temperatura ambiente)

6.4. Preparación de la Muestra

Extraer el ADN genómico de las muestras de los pacientes tan pronto como sea posible. Resuspender el ADN a una concentración final de 100 µg a 400 µg por mL en TE 1/10 (1 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 mM EDTA) o en agua grado biología molecular o grado USP. Este ensayo es un sistema robusto. Un amplio rango de concentraciones de ADN será capaz de generar un resultado válido. Por lo tanto, generalmente no son necesarios la cuantificación y el ajuste de las concentraciones de ADN. El análisis de la muestra problema de ADN con el *Specimen Control Size Ladder* asegurará que existe ADN en cantidad y calidad suficientes para generar un resultado válido.

6.5. Conservación de la Muestra

El ADN genómico debe conservarse entre 2°C y 8°C o entre -85°C y -65°C hasta el momento de su uso.

7. Procedimiento del Ensayo

7.1. Materiales Suministrados en el Kit

Tabla 3. Materiales Suministrados en el Kit

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

7.2. Materiales Requeridos pero No Suministrados en el Kit

Tabla 4. Materiales Requeridos pero No Suministrados en el Kit

Reactivo/Material	Reactivos/Materiales y Proveedores Recomendados	Número de Catálogo	Notas
ADN Polimerasa	Roche: - EagleTaq DNA Polymerase Invovoscribe : - FalconTaq DNA Polymerase o equivalente	05206944190 60970130	N/A
Agua Bi-Destilada Grado Biología Molecular o Agua Grado USP	N/A	N/A	libre de DNAsas y RNAsas.
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/A	Deben ser capaces de medir volúmenes exactos entre 1 µL y 1000 µL.
Termociclador	Bio-Rad: - MJ Research PTC-100 o PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer - PE 9600 o PE 9700	N/A	N/A
Mezcladores Vortex	N/A	N/A	N/A
Placas o tubos para PCR	N/A	N/A	Estériles
Puntas de pipetas con filtro	N/A	N/A	Estériles, libres de Pirógenos/RNAsas/DNAsas
Tubos para microcentrífuga	N/A	N/A	Estériles
Instrumento de Electroforesis Capilar ABI	Thermo Fisher Scientific: Series ABI 310, 3100, 3130 o 3500	N/A	N/A
Formamida Hi-Di	Thermo Fisher Scientific: Hi-Di™ Formamide	4311320	N/A
Estándares de tamaño	InvivoScribe: - Hi-Di Formamide w/ROX size standards for ABI 3100 Thermo Fisher Scientific: - Para instrumentos ABI 3100 o 3130: - GeneScan™ - 400HD [ROX]™ - Para instrumentos ABI 3500: - GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0	60980061 402985 4408399	N/A

Tabla 4. Materiales Requeridos pero No Suministrados en el Kit

Reactivo/Material	Reactivos/Materiales y Proveedores Recomendados	Número de Catálogo	Notas
Calibración Espectral de Colorantes	Thermo Fisher Scientific:		
	• Para instrumentos ABI 3100 y 3130:		
	• DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D)	4345827	
	• Para instrumentos ABI 310:		
	• NED Matrix Standard	402996	N/A
	• Y Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX]	401546	
	• Para instrumentos ABI 3500:		
	• DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)	4345833	
Polímero	Thermo Fisher Scientific:		
	• Polímero POP-4™:		
	• POP-4 for 310 Genetic Analyzers	402838	
	• POP-4 for 3100/3100-Avant Genetic Analyzers	4316355	
	• POP-4 for 3130/3130xL Genetic Analyzers	4352755	N/A
	• Polímero POP-7™:		
	• POP-7 for 3130/3130xL Genetic Analyzers	4352759	
	• POP-7 for 3500/3500xL Genetic Analyzers	4393714	
Solución tampón	Thermo Fisher Scientific:		
	• 10X Genetic Analyzer Buffer with EDTA	402824	Diluir 1:10 con agua estéril antes de usar

7.3. Preparación de los Reactivos

- Todas las muestras desconocidas deben ser analizadas usando la mezcla de reacción del *Specimen Control Size Ladder*. Esto se hace para asegurar que no están presentes inhibidores de la amplificación y que hay ADN en cantidad y calidad suficientes para generar un resultado válido.
- Los resultados generados con un análisis único son válidos; no obstante, se recomienda realizar el análisis de cada muestra por **duplicado** siempre que sea posible. Si el análisis por duplicado genera resultados inconsistentes, es necesario volver a ensayar o analizar la muestra.
- Los controles **positivo**, **negativo** y **blanco** deben ser analizados para cada una de las mezclas de reacción.
- Se recomienda maximizar el número de muestras en una misma carrera de secuenciación para evitar quedarse sin control negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA). En el caso de que el procesamiento de varias muestras simultáneamente no sea práctico en su laboratorio, es posible adquirir el control policlonal IVS-0000 por separado.

7.3.1. Usando guantes, sacar las mezclas de reacción de reacción del congelador. Dejar que los tubos se descongelen completamente y entonces mezclar suavemente.

7.3.2. En una cabina de contención tomar una alícuota suficiente de cada mezcla de reacción y transferirla a tubos de microcentrífuga individuales, limpios y estériles.

- Los volúmenes de las alícuotas deben ser de 45 µL para cada reacción.
- Se recomienda añadir una reacción extra por cada 15 reacciones, para compensar los errores de pipeteo. De esta manera, para cada mezcla de reacción (excepto para el *Specimen Control Size Ladder*), el número de reacciones (**n**) debe ser:

n =	2 × # de muestras	(correr cada muestra por duplicado)
	+ 1	control positivo de ADN (Ver Tabla 6)
	+ 1	control negativo ADN (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
	+ 1	control sin templado o blanco (agua)
	+ 1	para compensar los errores de pipeto
n =	2 × # de muestras + 4	Total

- Por lo tanto el volumen total de alícuota para cada mezcla de reacción debería ser **n × 45 µL**.
- Para la mezcla de reacción del *Specimen Control Size Ladder*, el número de reacciones (**m**) debería ser:

m = # de muestras	(correr cada muestra por duplicado)
+ 1	control negativo de ADN (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	control sin templado o blanco (agua)
+ 1	para compensar los errores de pipeto
m = # de muestras + 3	Total

- Por lo tanto el volumen total de alícuota para la mezcla de reacción del *Specimen Control Size Ladder* debería ser **m × 45 µL**.

- 7.3.3. **Para los Tubos *TCRBA* y *B*:** Añadir 2.25 unidades (o 0.45 μL a 5 unidades/ μL) de ADN polimerasa Taq por reacción a cada mezcla de reacción.
- El total de polimerasa Taq que es necesaria añadir a cada mezcla maestra de reacción deberá ser $n \times 0.45 \mu\text{L}$. Mezclar suavemente con vortex.
- 7.3.4. **Para los Tubos *TCRBC* y *Specimen Control Size Ladder*:** Añadir 1.25 unidades (o 0.25 μL a 5 unidades/ μL) de ADN polimerasa Taq por reacción a cada mezcla de reacción.
- El total de polimerasa Taq que es necesaria añadir a cada mezcla maestra de reacción deberá ser $n \times 0.25 \mu\text{L}$, y $m \times 0.25 \mu\text{L}$ para la mezcla de reacción del *Specimen Control Size Ladder*.
 - Mezclar suavemente con vortex.
- 7.3.5. Para cada reacción, alicuotar 45 μL de la respectiva mezcla de reacción + ADN polimerasa en cada pocillo de una placa de PCR o tubo.
- 7.3.6. Añadir 5 μL de la muestra correspondiente (muestra problema de ADN, control positivo de ADN, control negativo de ADN, o agua) en cada pocillo que contenga las respectivas mezclas de reacción. Mezclar suavemente con la pipeta varias veces.
- 7.3.7. Tapar los tubos o cubrir la placa de PCR.
- Las muestras están ahora listas para ser amplificadas en un termociclador.
- 7.3.8. Si la amplificación no puede realizarse inmediatamente después de la preparación de los reactivos, la placa de PCR o los tubos pueden ser conservados entre 2°C y 8°C por un período de hasta 24 horas.

Guía Rápida

Para cada mezcla de reacción de reacción y n reacciones, mezclar:

$n \times 45 \mu\text{L}$ Mezcla de Reacción

$n \times 0.25 \mu\text{L}$ or $0.45 \mu\text{L}^*$ ADN polimerasa Taq

Vortear suavemente para mezclar.

Alicuotar 45 μL de mezcla de reacción + solución de ADN polimerasa en cada reservorio de reacción.

Agregar 5 μL del respectivo Templado a cada reservorio.

Volumen total de reacción = 50 μL

*Nota:

Usar 0.45 μL de ADN polimerasa Taq para los Tubos *TCRB A* y *B* y 0.25 μL de ADN polimerasa Taq para los Tubos *TCRB C* y *Specimen Control Size Ladder*

7.4. Amplificación

- 7.4.1. Amplificar las muestras usando el siguiente programa de PCR:
- Usar la opción **calculada** para la medición de la temperatura con los termocicladores PTC BioRad MJ Research.

Tabla 5. Programa Estándar para Taq

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

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

7.5. Detección de Fluorescencia ABI

No se recomienda analizar mezclas de productos de PCR de diferentes mezclas de reacción, ya que esto resultará en una reducción global de la sensibilidad del ensayo.

Plataformas ABI 310, 3100, o 3130

- 7.5.1. En un tubo de microcentrífuga nuevo, mezclar una cantidad apropiada (para un total de 10 µl por reacción de PCR) de Formamida Hi-Di con estándares de tamaño ROX.^a Mezclar bien con vortex.
- 7.5.2. En una nueva placa de PCR de 96 pocillos, pipetear 10 µL de Formamida Hi-Di con estándares de tamaño ROX en cada pocillo para cada reacción de PCR.
- 7.5.3. Añadir 1 µL de cada reacción de PCR a los pocillos que contienen Formamida Hi-Di con estándares de tamaño ROX. Añadir sólo una muestra por pocillo. Mezclar con la pipeta.
- 7.5.4. Tapar los tubos o cubrir la placa de PCR.
- 7.5.5. Desnaturalizar las muestras con calor a 95°C durante 2 minutos, seguido de un enfriamiento en hielo durante 5 minutos.
- 7.5.6. Preparar una hoja de muestras y la lista de inyección para las muestras a analizar.
- 7.5.7. Correr las muestras en el instrumento de electroforesis capilar siguiendo el manual del usuario.
- 7.5.8. Los resultados son automáticamente mostrados como picos de tamaño y color específicos. Revisar el trazado y los controles y luego informar el resultado. (Ver secciones 8 *Interpretación de los Resultados* y 10 *Valores Esperados debajo*).

Plataformas ABI 3500:

Nota: Debido a que pueden existir variaciones en el desempeño de la plataforma ABI 3500 cuando se la utiliza en diferentes instrumentos, las cantidades de formamida, muestra problema y estándares de tamaño detalladas en el protocolo son orientativas y a ser usadas como punto de partida. Es probable que sea necesario optimizar el protocolo para determinadas Plataformas ABI 3500.

- 7.5.9. En un nuevo tubo de microcentrífuga, mezclar una cantidad apropiada (9.5 µL por reacción de PCR) de Formamida Hi-Di con Estándares de Tamaño LIZ.^a Mezclar bien con vortex.
- 7.5.10. En una nueva placa de PCR de 96 pocillos, añadir 9.5 µL de Formamida Hi-Di con Estándares de Tamaño LIZ a cada pocillo para cada reacción de PCR.
- 7.5.11. Transferir 0.5 µL de cada reacción de PCR a los pocillos que contienen Formamida Hi-Di con Estándares de Tamaño LIZ. Añadir sólo una muestra por pocillo. Mezclar mediante pipeteo.
- 7.5.12. Tapar o cubrir la placa de PCR.
- 7.5.13. Desnaturalizar las muestras con calor a 95°C durante 3 minutos, seguido de un rápido enfriamiento en hielo durante 5 minutos.
- 7.5.14. Preparar una **hoja de muestras** y la **lista de inyección** para las muestras a analizar.
- 7.5.15. Correr las muestras en un instrumento de electroforesis capilar ABI 3500 de acuerdo con su manual del usuario.
- 7.5.16. Los resultados son automáticamente mostrados como picos de tamaño y color específicos. Revisar el trazado y los controles y luego informar el resultado. (Ver las secciones 8 *Interpretación de los Resultados* y 10 *Valores Esperados*).

7.6. Control de Calidad

En el kit se suministran controles positivos y negativos (o normales) y deben ser analizados cada vez que se desarrolla el ensayo para asegurar el desarrollo apropiado del mismo. Adicionalmente, se debe incluir un control sin DNA (por ej. agua) para controlar la posible contaminación de la mezcla de reacción o la contaminación cruzada de las reacciones de PCR debidas al empleo de técnicas asépticas inadecuadas. También se debe incluir un control de la solución tampón para asegurar que el tampón utilizado para resuspender las muestras no ha sido contaminado. Los valores de los controles positivos se encuentran en la sección 10.1 *Tamaño Esperado de los Productos Amplificados*. Controles adicionales y controles de sensibilidad (diluciones de los controles positivos en el control negativo) se encuentran disponibles en Invivoscribe.

7.7. Controles Positivos Recomendados

Los tamaños de los productos amplificados mostrados en la tabla se obtuvieron usando una plataforma ABI. Los tamaños de los productos amplificados obtenidos en su instrumento de electroforesis capilar específico pueden diferir en 1 a 4 base par (bp) de los que se encuentran en la tabla, dependiendo de la plataforma de detección y de la versión del programa de análisis utilizados. Una vez identificado, el tamaño del amplicón determinado en su plataforma específica será consistente entre diferentes electroforesis. Esta reproducibilidad es extremadamente útil cuando se hace un seguimiento de enfermedad recurrente.

Nota: “Color” indica el color de los productos generados con la mezcla de reacción cuando se usan las asignaciones de color por defecto de los sistemas de detección de fluorescencia ABI.

Tabla 6. Controles Positivos Recomendados

Mezcla de Reacción	Secuencia Blanco	Color	ADN Control	Número de Catálogo	Tamaño del Producto (bp)
<i>TCRB</i> Tube A	Vβ + Jβ1/2	Azul (Jβ2.X) + Verde (Jβ1.X)	Rango de Tamaños Válido IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	240 - 285 264
<i>TCRB</i> Tube B	Vβ + Jβ2	Azul (Jβ2.X)	Rango de Tamaños Válido IVS-0004 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40880190 40881210	240 - 285 253 267
<i>TCRB</i> Tube C	Dβ + Jβ1/2	Azul (Jβ2.X) + Verde (Jβ1.X)	Rango de Tamaños Válido IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	170 - 210 (Dβ2), 285 - 325 (Dβ1) 309
Specimen Control Size Ladder	Genes Múltiples	Azul	Rango de Tamaños Válido IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397 602^a 96, 197, 297, 397, 602 ^a

^aNota: Debido a que los fragmentos de PCR de menor tamaño son preferencialmente amplificados, es normal que el fragmento de 602 bp presente una señal disminuida o que se pierda completamente. Durante los tiempos normales de electroforesis en los equipos ABI, el pico de 602 bp puede no llegar a aparecer. Más aún, el tamaño de este pico puede diferir en 30bp cuando el tamaño del fragmento es calculado utilizando el estándar de tamaño GeneScan - 400HD [ROX].

8. Interpretación de los Resultados

Aunque un resultado positivo es altamente sugestivo de un proceso neoplásico, tanto los resultados positivos como los negativos deben interpretarse en un contexto global con toda la información clínica y los resultados de los ensayos del laboratorio. El rango de tamaños para cada una de las mezclas de reacción ha sido determinado analizando muestras control positivas y negativas. Para una interpretación exacta y significativa es importante tener en cuenta que se deben ignorar las bandas que aparezcan fuera del rango de tamaños válido para cada una de las mezclas de reacción.

8.1. Análisis

- 8.1.1. Muestras que no amplifican después de ser ensayadas repetidamente deben ser informadas como “No se puede informar un resultado de esta muestra debido a que no se obtiene ADN en cantidad o calidad suficiente para su análisis”.
- 8.1.2. Muestras que generan un resultado negativo deben ser repetidas si el control positivo de la reacción no amplificó.
- 8.1.3. Si las muestras analizadas por duplicado generan resultados diferentes, el ensayo debe ser repetido o vuelto a evaluar para aclarar un posible cambio de muestras.
- 8.1.4. Todos los controles del ensayo deben ser examinados previamente a la interpretación de los resultados de la muestra problema.

Tabla 7. La siguiente tabla describe el análisis de cada uno de los controles y las acciones a seguir basándose en los resultados obtenidos.

Tipo de Control	Resultado Esperado	Resultado Aberrante
Control Sin Templado	No presenta amplificación, continuar con el análisis.	Amplificación presente, repetir el ensayo.
Control Policlonal	El tamaño del producto es consistente con el tamaño esperado de acuerdo a la lista de la sección 10.1 <i>Tamaño Esperado de los Productos Amplificados</i> . No hay reordenamientos clonales presentes. Continuar con el análisis.	Presenta reordenamientos clonales, repetir el ensayo.
Control Positivo (Este también puede ser un control de extracción si se añade un material control positivo a través de los procesos de extracción)	El tamaño del producto es consistente con el tamaño esperado de acuerdo a la lista de la sección 10.1 <i>Tamaño Esperado de los Productos Amplificados</i> . Continuar con el análisis.	Gama de tamaño del producto no esperado. Repetir el ensayo.
Specimen Control Size Ladder (Este control de amplificación es <u>esencial</u> para muestras de calidad y cantidad desconocida.)	Si todos los picos de 96, 197, 297, 397 y 602 bp están presentes, continuar con el análisis. Debido a que los fragmentos de PCR de menor tamaño son preferencialmente amplificados, es normal que el fragmento de 602 bp presente una señal disminuida o que se pierda completamente. Continuar con el análisis.	Si no se observan bandas, repetir el ensayo <u>a menos que la muestra resulte positiva</u> . Si sólo se observan 1, 2, o 3 bandas, re-evaluar la muestra para determinar una posible degradación del ADN <u>a menos que la muestra resulte positiva</u> .

8.2. Interpretación de la Muestra Problema

- Cuando los controles generan los resultados esperados, las muestras clínicas deben ser interpretadas como se detalla a continuación:
 - Uno o dos picos positivos prominentes^a dentro del rango de tamaños válido se informa como:
“Positivo para la detección de reordenamiento(s) clonal(es) del gen de la cadena beta del receptor de la célula T es consistente con la presencia de una población celular clonal. En un contexto global de criterios diagnósticos, las poblaciones celulares clonales pueden indicar la presencia de una neoplasia hematológica.”
 - La ausencia de picos positivos^a dentro del rango de tamaños válido se informa como:
“Negativo para la detección de reordenamientos clonales del gen de la cadena beta del receptor de la célula T.”

^a**Nota:** Los criterios para definir un pico positivo son los siguientes:

- Los productos generados de **muestras al diagnóstico** que caen dentro del rango de tamaños válido y tienen una amplitud de al menos tres veces la amplitud del tercer pico más grande del fondo policlonal, son consistentes con un pico positivo.
- Los productos generados de **muestras recolectadas después del diagnóstico inicial** que caen dentro del rango de tamaños válido y son: bien 1) de una amplitud de al menos tres veces la amplitud del tercer pico mas grande; o bien, 2) exceden la amplitud de los picos vecinos adyacentes y son idénticos en tamaño a los productos clonales amplificados previamente en muestras del mismo paciente usando la misma mezcla de reacción, son consistentes con un pico positivo.

9. Limitaciones del Ensayo

- Este ensayo no identifica el 100% de las poblaciones celulares clonales.
- Este ensayo no puede detectar de manera fiable una cantidad menor de 1 célula positiva por cada 100 células normales.
- Los resultados de las pruebas moleculares de clonalidad siempre deben ser interpretados en el contexto global de datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos.
- Los ensayos basados en la técnica de PCR están sujetos a interferencia por la degradación del ADN o por la inhibición de la PCR debida a EDTA, heparina y otros agentes.

10. Valores Esperados

10.1. Tamaño Esperado de los Productos Amplificados

Los tamaños de los productos amplificados mostrados en la tabla se obtuvieron usando una plataforma ABI. Los tamaños de los productos amplificados obtenidos en su instrumento de electroforesis capilar específico pueden diferir en 1 a 4 base par (bp) de los que se encuentran en la tabla, dependiendo de la plataforma de detección y de la versión del programa de análisis utilizados. Una vez identificado, el tamaño del amplicón determinado en su plataforma específica será consistente entre diferentes electroforesis. Esta reproducibilidad es extremadamente útil cuando se hace un seguimiento de enfermedad recurrente.

Nota: “Color” indica el color de los productos generados con la mezcla de reacción cuando se usan las asignaciones de color por defecto de los sistemas de detección de fluorescencia ABI.

Tabla 8. Tamaño Esperado de los Productos Amplificados

Mezcla de Reacción	Secuencia Blanco	Color	ADN Control	Número de Catálogo	Tamaño del Producto (bp)
TCRBTube A	Vβ + Jβ1/2	Azul (Jβ2.X) + Verdi (Jβ1.X)	Rango de Tamaños Válido IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0004 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880490 40880190	240 - 285 240 - 285, 271 ^a 264 295
TCRBTube B	Vβ + Jβ2	Azul (Jβ2.X)	Rango de Tamaños Válido IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA IVS-0004 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880490 40881210 40880190	240 - 285 240 - 285, 221 ^b --- 267 253
TCRBTube C	Dβ + Jβ1/2	Azul (Jβ2.X) + Verdi (Jβ1.X)	Rango de Tamaños Válido IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0004 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880490 40880190	170 - 210 (Dβ2), 285 - 325 (Dβ1) 128 ^b , 170 - 210, 285 - 325, 337 ^b 309 295
Specimen Control Size Ladder	Genes Múltiples	Azul	Rango de Tamaños Válido IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397 602^c 96, 197, 297, 397, 602 ^c

^aNota: La banda de 271 bp se ve particularmente en muestras con bajo número de células linfoides contaminantes.

^bNota: Bajo condiciones sub-óptimas, pueden ser detectados productos inespecíficos de 221 bp (en el Tubo B) y de 128 bp y 337 bp (en el Tubo C). De encontrarse presentes, estas bandas se visualizarán como desvanecidas.

^cNota: Debido a que los fragmentos de PCR de menor tamaño son preferencialmente amplificados, es normal que el fragmento de 602 bp presente una señal disminuida o que se pierda completamente. Durante los tiempos normales de electroforesis en los equipos ABI, el pico de 602 bp puede no llegar a aparecer. Más aún, el tamaño de este pico puede diferir en 30 bp cuando el tamaño del fragmento es calculado utilizando el estándar de tamaño GeneScan - 400HD [ROX].

10.2. Resultados de la Muestra

Los resultados que se muestran a continuación fueron generados utilizando las mezclas de reacción indicadas. Los productos amplificados fueron resueltos en un instrumento ABI.

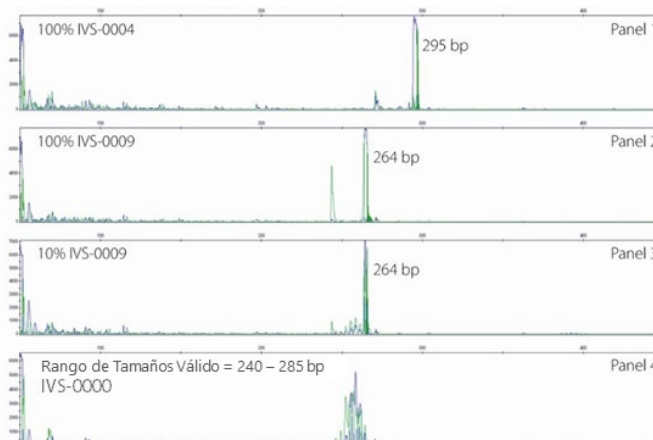


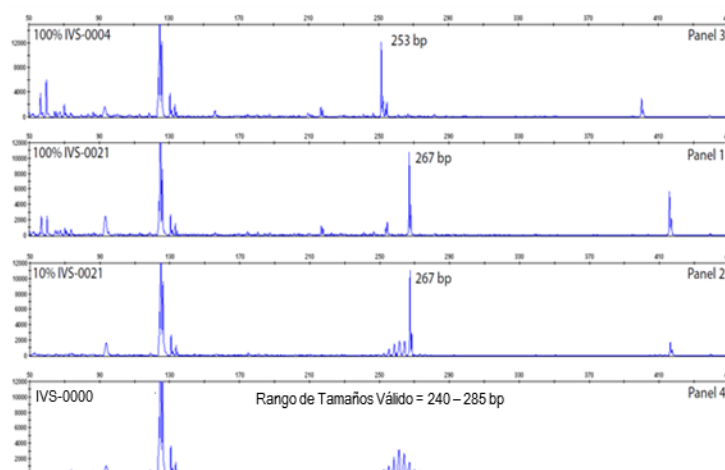
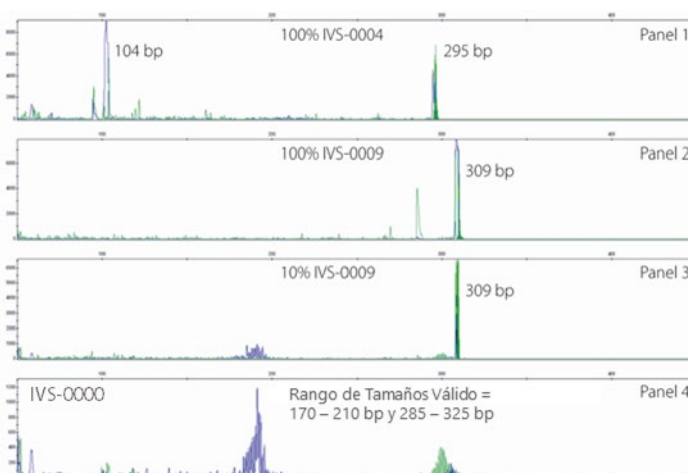
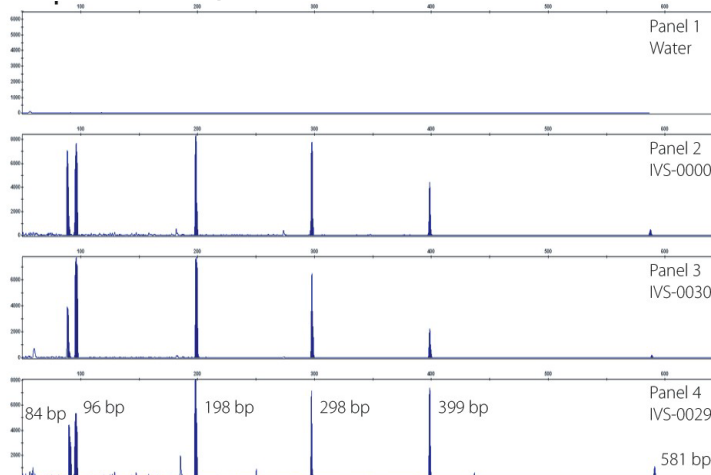
Figura 2. *TCRB* Tube A - 6FAM & HEX

Figura 3. *TCRB* Tube B - 6FAM

Figura 4. *TCRB* Tube C - 6FAM & HEX


Figura 5. Le Specimen Control Size Ladder – 6FAM

11. Características Analíticas

El IdentiClone *TCRB* Gene Clonality Assay, es un procedimiento rápido y fiable, que es mucho más sensible que el análisis mediante Southern Blot (SB) para la detección de clonalidad en casos de sospecha de enfermedades linfoproliferativas. El diagnóstico final clínico-histopatológico se correlaciona muy bien con los resultados de PCR en un gran número de pacientes en comparación con los resultados de SB. Esto fue evidenciado por dos trabajos relevantes, uno publicado en 2003 en la revista *Leukemia* por van Dongen *et al.* y el otro publicado en 2005 en la revista *Journal of Molecular Diagnostics (JMD)* por Sandberg *et al.*

Tabla 9. Comparación de PCR y detección Southern Blot

Concordancia PCR/SB (<i>Leukemia</i> ²):		Concordancia PCR/SB (<i>JMD</i> ³):	
<i>IGH</i> :	93% sensitivity/ 92% specificity	<i>IGH + IGK</i> :	85% sensitivity
<i>IGK</i> :	90% sensitivity/ 90% specificity		
<i>IGL</i> :	86% sensitivity/ 92% specificity		
<i>TCRB</i> :	86% sensitivity/ 98% specificity	<i>TCRB</i> :	85% sensitivity
<i>TCRG</i> :	89% sensitivity/ 94% specificity		
<i>TCRD</i> :	83% sensitivity/ 95% specificity		

Tabla 10. Análisis PCR vs. SB en relación a la histopatología y al diagnóstico final:

	Concordancia PCR/SB:	Sendibilidad de la PCR:	Sendibilidad de la SB:
<i>IGH + IGK</i> :	85%	98%	39%
<i>TCRB</i> :	85%	96%	35%

El estudio realizado por Sandberg *et al.* fue un estudio independiente en 300 muestras de pacientes, con una gran variedad de tipos de muestras. En los casos donde se realizaron análisis de PCR y SB, y los resultados pudieron ser correlacionados con la histopatología y el diagnóstico final, la exactitud diagnóstica de los ensayos IdentiClone fue determinada como de al menos un 96%. Por tanto, el análisis mediante PCR fue mucho mas exacto que el análisis mediante SB que falló en detectar 23 casos claros y 7 casos probables de enfermedad neoplásica en este estudio. Usando los ensayos IdentiClone, no se detectaron resultados falsos positivos claros y se observó un alto nivel de precisión.³ Además, un claro beneficio de este ensayo fue que los resultados clonales generados por el mismo permitieron una detección subsecuente de reordenamientos genéticos específicos de paciente y de tumor para la detección de enfermedad mínima residual.

12. Servicio Técnico y al Cliente

Los representantes técnicos y de atención al cliente están disponibles de lunes a viernes para responder a todas sus preguntas, mediante consultas telefónicas, por correo electrónico o en la web.

Datos de Contacto



Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | Estados Unidos

Teléfono: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Horario comercial: De 07:00 a 17:00 PST/PDT

Servicio técnico: support@invivoscribe.com | Atención al cliente: sales@invivoscribe.com | Sitio web: www.invivoscribe.com

13. Bibliografía

1. Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. (1999). An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Molecular Diagnostics* 4, 101-117.
2. Van Dongen, JJM *et al.* (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 17, 2257-2317.
3. Sandberg, Y, *et al.* (2005). BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern Blot analysis in routine clonality diagnostics. *J. Molecular Diagnostic* 7, 495-503.
4. van Krieken, JHJM *et al.* (2007). Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: – Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 21, 201-206.

14. Simbolgía utilizada

	Número de Catálogo		Fecha de Caducidad
	Volumen de Reactivo		Representante Autorizado en la Comunidad Europea
	Número de Lote		Consulte las instrucciones de uso
	Condiciones de Conservación		Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Identificador Único de Dispositivo		Fabricante
	Conformidad del Reino Unido Evaluada		Persona Responsable del Reino Unido
	Representante Autorizado en Suiza		Conformidad Europea

15. Aspectos Legales

15.1. Garantía y responsabilidad

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) se compromete a proporcionar productos de la más alta calidad. Invivoscribe® garantiza que los productos cumplen o superan los estándares de rendimiento descritos en las Instrucciones de uso, en cuanto a los productos con dicho inserto. Si un producto está cubierto por las especificaciones del producto y no funciona como se especifica, nuestra política es reemplazar el producto o acreditar el precio total de compra. Invivoscribe® no ofrece ninguna otra garantía de ningún tipo, expresa o implícita. La responsabilidad de Invivoscribe® no excederá el precio de compra del producto. Invivoscribe no será responsable por daños directos, indirectos, consecuentes o incidentales que surjan del uso, los resultados del uso o la imposibilidad de usar sus productos; la eficacia del producto bajo condiciones controladas por el comprador en el laboratorio del comprador debe establecerse y monitorearse continuamente a través de procesos definidos y controlados por el comprador, que incluyen, entre otros, pruebas de controles positivos, negativos y en blanco 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 establecida en este párrafo.

Este producto es un producto de diagnóstico in vitro que no está disponible para la venta o uso en América del Norte.

15.2. Patentes y Marcas Registradas

Este producto está cubierto por uno o más de los siguientes: número de patente europea 1549764, número de patente europea 2418287, número de patente europea 2460889, número de patente japonesa 4708029, patente de Estados Unidos 8859748 y solicitudes pendientes y futuras relacionadas. Todas estas patentes y solicitudes tienen licencia exclusiva para Invivoscribe®. Las patentes adicionales con licencia para Invivoscribe que cubren algunos de estos productos se aplican en otros lugares. Muchos de estos productos requieren métodos de amplificación de ácido nucleico como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ninguna licencia bajo estas patentes para usar procesos de amplificación o enzimas se transmite expresamente o implícitamente al comprador por la compra de este producto.

Identiclone® es una marca registrada de Invivoscribe®

©2023 Invivoscribe, Inc. Todos los derechos reservados. Las marcas comerciales mencionadas aquí son propiedad de Invivoscribe, Inc. y / o sus afiliados o (en cuanto a las marcas comerciales de otros utilizados aquí) sus respectivos propietarios.