IdentiClone®

Instrucciones de uso

IdentiClone® *TCRG* Gene Clonality Assay

CE IVD

Para la identificación de reordenamientos génicos de la cadena gamma del receptor de linfocitos T (*TCRG*) clonales.

IVD Para uso diagnóstico *in vitro*.

invivoscribe

Condiciones de conservación: de **−85°C a −65°C**

Los controles de ADN pueden separarse de los kits de prueba y conservarse a entre 2°C y 8°C.

Núm. de catálogo	Productos	Cantidad
REF 92070020	IdentiClone *TCRG* Gene Clonality Assay – Gel Detection	33 reacciones
REF 92070040	IdentiClone *TCRG* Gene Clonality Assay MegaKit – Gel Detection	330 reacciones

Índice

1. USO PREVISTO 3

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA 3

2.1. Antecedentes 3
2.2. Descripción general 3

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO 4

3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 4
3.2. Detección en gel 4

4. REACTIVOS 5

4.1. Componentes del reactivo 5
4.2. Advertencias y precauciones 6
4.3. Almacenamiento y manipulación 6

5. INSTRUMENTAL 7

5.1. Termociclador 7
5.2. Unidad de electroforesis 7
5.3. Unidad de iluminación UV 7

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS 8

6.1. Precauciones 8
6.2. Sustancias interferentes 8
6.3. Requisitos y manipulación de las muestras 8
6.4. Preparación de las muestras 8
6.5. Almacenamiento de las muestras 8

7. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA 9

7.1. Materiales suministrados 9
7.2. Materiales necesarios no suministrados 9
7.3. Preparación de los reactivos 10
7.4. Amplificación 11
7.5. Detección en gel: análisis de heterodúplex 11
7.6. Control de calidad 12
7.7. Controles positivos recomendados 12

8. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS 13

8.1. Análisis 13
8.2. Interpretación de la muestra 13

9. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO 14

10. VALORES PREVISTOS 14

10.1. Tamaño previsto de los productos amplificados 14
10.2. Datos de la muestra 15

11. EFICACIA DIAGNÓSTICA 15

12. BIBLIOGRAFÍA 16

13. SERVICIO TÉCNICO Y ATENCIÓN AL CLIENTE 16

14. SÍMBOLOS 16

15. AVISO LEGAL 17

15.1. Garantía y responsabilidad 17
15.2. Patentes y marcas registradas 17
15.3. Aviso para el comprador: SOLO para ADN polimerasa EagleTaq 17

1. Uso previsto

La IdentiClone *TCRG* Gene Clonality Assay es un producto de diagnóstico *in vitro* diseñado para la detección mediante PCR de reordenamientos génicos de la cadena gamma del receptor de linfocitos T clonales en pacientes con sospecha de trastornos linfoproliferativos, que sirve específicamente para:

- Identificar la presencia de clonalidad en posibles trastornos linfoproliferativos.
- Respaldar un diagnóstico diferencial de lesiones reactivas y neoplasias malignas de los linfocitos T y de algunos linfocitos B inmaduros.
- Determinar la implicación de la estirpe en los trastornos linfoproliferativos maduros.
- Controlar y evaluar las recidivas de la enfermedad.

2. Resumen y explicación de la prueba

2.1. Antecedentes

El reordenamiento de los genes de los receptores de antígenos se produce durante la ontogenia de los linfocitos B y T. Estos reordenamientos génicos generan productos únicos 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 de los genes V-J del locus del receptor de antígenos.[1] En la prueba por PCR, se utilizan distintos cebadores de ADN que se dirigen a regiones génicas conservadas del gen de la cadena gamma del receptor de linfocitos T. Esta prueba, basada en ADN, sirve para detectar la gran mayoría de las neoplasias de los linfocitos T 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 se han optimizado minuciosamente mediante el análisis de muestras de control positivas y negativas con varias mezclas maestras. 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. [2]

Las pruebas de detección en 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

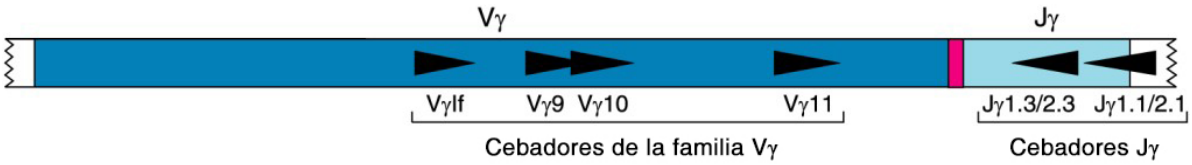
Este kit de prueba incluye tres (3) mezclas maestras. La mezcla maestra *TCRG* Tube A (Tubo A de *TCRG*) contiene una serie de cebadores que se dirige a los genes Vγ1-8 + Vγ10 y a los genes Jγ1.1, Jγ1.3, Jγ2.1 y Jγ2.3 (también conocidos como JγP1, Jγ1, JγP2 y Jγ2, respectivamente). La mezcla maestra *TCRG* Tube B (Tubo B de *TCRG*) contiene una serie de cebadores que se dirige a los genes Vγ9 + Vγ11 y a los genes Jγ1.1, Jγ1.3, Jγ2.1 y Jγ2.3. Finalmente, la mezcla maestra Specimen Control Size Ladder (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 el mismo programa del termociclador y métodos de detección similares, lo que garantiza la uniformidad y facilita la formación cruzada sobre distintas pruebas.

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 T. Estas pruebas amplifican el ADN situado entre los cebadores dirigidos a las regiones de conservación variables (V) y de unión (J) que flanquean la región hipervariable determinante de complementariedad 3 (CDR3). Las regiones de conservación se encuentran a ambos lados de la región V-J en la que se producen los reordenamientos génicos 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 longitud y en 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. En gel, la distribución de los productos adopta la forma de una extensión y la 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.



***TCRG* Tube A (Tubo A de *TCRG*): cebadores Vγ1f y Vγ10 + Jγ1.1/2.1 y Jγ1.3/2.3**
***TCRG* Tube B (Tubo B de *TCRG*): cebadores Vγ9 y Vγ11 + Jγ1.1/2.1 y Jγ1.3/2.3**

Figura 1. Este es un diagrama simplificado de un reordenamiento representativo del gen de la cadena gamma del receptor de linfocitos T que representa la colocación aproximada de los cebadores de ADN corriente arriba y corriente abajo. Aparecen los números de los cebadores y su especificidad para las mezclas maestras Tube A (Tubo A) y Tube B (Tubo B). El cebador Vγ1f es un cebador de consenso que se dirige desde Vγ1 hasta Vγ8.

Dado que los genes del receptor de antígenos son polimórficos (están formados por una población heterogénea de secuencias de ADN relacionadas), es difícil emplear un solo conjunto de secuencias de cebadores de ADN para dirigirse a todas las regiones de conservación 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 mezclas maestras múltiples, dirigidas a distintas regiones V, 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 en 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 ejerce 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, lo que da lugar a la separación de los productos del amplicón en función del tamaño. A continuación, puede usarse ethidium bromide (bromuro de etidio) u otros colorantes por intercalación del ADN para teñir y detectar estos productos en el gel.

También puede realizarse un análisis de heterodúplex con un gel de poliacrilamida para diferenciar los productos clonales de los no clonales en la PCR. El análisis de heterodúplex implica desnaturalizar los productos de la PCR a una temperatura elevada y recocer rápidamente las cadenas de ADN para reducir la temperatura. Esto hace que una gran parte de las cadenas de ADN se unan incorrectamente a otras cadenas no homólogas, lo que genera 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 mayoría de los productos de PCR se reasociarán correctamente con una cadena homóloga. Los productos de la PCR 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, lo que incrementará su separación y la capacidad de identificar las bandas clonales.

4. Reactivos

4.1. Componentes del reactivo

Tabla 1: Pruebas disponibles

Número de catálogo	Descripción	Cantidad
REF 92070020	IdentiClone *TCRG* Gene Clonality Assay – Gel Detection	33 reacciones
REF 92070040	IdentiClone *TCRG* Gene Clonality Assay MegaKit – Gel Detection	330 reacciones

Tabla 2: Componentes del kit

Reactivo	Número de catálogo (REF)	Componentes de los reactivos (principios activos)	Cantidad por unidad	92070020 Número de unidades	92070040 Número de unidades	Temp. de conservación
Mezclas maestras	22070030CE	***TCRG* Tube A - Unlabeled** **(Tubo A de *TCRG*, sin marcar)** Distintos oligonucleótidos dirigidos a las regiones Vγ1-8, Vγ10 y a varias regiones Jγ del gen de la cadena gamma del receptor de linfocitos T en una solución salina amortiguada.	1500 µL	1	10	-85 °C a -65 °C
	22070040CE	***TCRG* Tube B - Unlabeled** **(Tubo B de *TCRG*, sin marcar)** Distintos oligonucleótidos dirigidos a las regiones Vγ9, Vγ11 y a varias regiones Jγ del gen de la cadena gamma del receptor de linfocitos T en una solución salina amortiguada.	1500 µL	1	10	
Mezcla maestra 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	10	
ADN de control positivo	40880490	**IVS-0009 Clonal Control DNA** **(ADN de control clonal IVS-0009)** 200 µg/mL de ADN en TE 1/10	100 µL	1	5	2 °C a 8 °C o -85 °C a -65 °C
	40881210	**IVS-0021 Clonal Control DNA** **(ADN de control clonal IVS-0021)** 200 µg/mL de ADN en TE 1/10	100 µL	1	5	
ADN de control negativo (normal)	40920010	**IVS-0000 Polyclonal Control DNA** **(ADN de control policlonal IVS-0000)** 200 µg/mL de ADN en TE 1/10	100 µL	1	5	

Nota: No se han utilizado conservantes en la fabricación de este kit.

4.2. Advertencias y precauciones

- IVD Este producto es para uso diagnóstico *in vitro*.
- Utilice este kit de análisis 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 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 individual 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. Use agua de calidad para procedimientos de 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, material de referencia o material amplificado. Deben controlarse todos los reactivos para tratar de detectar signos de contaminación (p. ej., controles negativos que generen 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 pruebas por PCR.
- El autoclave no elimina la contaminación del ADN. En el laboratorio de PCR, siga una secuencia de trabajo unidireccional entre zonas de trabajo: zona de preparación de mezclas maestras, zona de preparación de muestras, zona de amplificación y zona de detección. No lleve ADN amplificado a las zonas designadas para la preparación de mezclas maestras y muestras.
- Las pipetas, puntas de pipetas y cualquier otro instrumento utilizado en una zona específica 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. Almacenamiento y manipulación

- Si no va a hacer un uso inmediato de los kits de prueba, **consérvelos a una temperatura de entre −85°C y −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 a entre −85°C y −65°C.
- Tanto los reactivos como el material de referencia deben descongelarse y mezclarse en un agitador vorticial antes de usarse para garantizar la 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 maestras para PCR son sensibles a los ciclos de congelación/descongelación. Vierta las mezclas maestras 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.
- Eficacia diagnóstica y especificación:
  - Intervalo térmico mínimo: de 15°C a 96°C.
  - Velocidad de aceleración mínima: 0,8°C/s.
- Siga las instrucciones 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.
- Eficacia diagnóstica y especificación:
  - Capacidad para funcionar a 35-135 V durante períodos prolongados.
- Siga las instrucciones de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante.

5.3. Unidad de iluminación UV

- Uso o función: detección de ADN.
- Eficacia diagnóstica y especificación:
  - Capacidad para emitir luz a una longitud de onda aproximada de 302 nm.
- Siga las instrucciones 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 interferentes

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

Con este kit, puede analizarse **ADN genómico** (ADNg) con 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 (conservados y enviados congelados o conservados y enviados en RPMI 1640 a temperatura ambiente o en hielo).
- 2 µg de ADN genómico (conservados a entre 2°C y 8°C y enviados a temperatura ambiente).
- Tejido o cortes fijados en formol e incluidos en parafina (conservados y enviados a temperatura ambiente).

6.4. Preparación de las muestras

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 TE 1/10 (1 mM de Tris-HCl, pH 8,0 y 0,1 mM de EDTA) o en agua de calidad para 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, cuantificar y ajustar las concentraciones de ADN no suele ser necesario. Analizar el ADN de la muestra con la Specimen Control Size Ladder garantizará que la calidad y la cantidad del ADN sean suficientes para que el resultado sea válido.

6.5. Almacenamiento de las muestras

Conserve el ADNg a entre 2°C y 8°C o a entre −85°C y −65°C para una conservación a largo plazo.

7. Procedimiento de la prueba

7.1. Materiales suministrados

Tabla 3: Componentes del kit

Número de catálogo	Descripción
REF 22070030CE	*TCRG* Tube A - Unlabeled (Tubo A de *TCRG*, sin marcar)
REF 22070040CE	*TCRG* Tube B - Unlabeled (Tubo B de *TCRG*, sin marcar)
REF 20960020	Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (Control de la muestra con marcador de tamaño, sin marcar)
REF 40880490	IVS-0009 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0009)
REF 40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0021)
REF 40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de control policlonal IVS-0000)

7.2. Materiales necesarios no suministrados

Tabla 4: Materiales necesarios no suministrados

Reactivo/material	Reactivos o material recomendado y proveedores	Número de catálogo	Notas
ADN polimerasa	Roche: • DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq Invivoscribe, Inc.: • DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq[1] o equivalente	05206944190 60970100	N. P.
Agua de calidad USP o para biología molecular 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 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. P.	N. P.
Agitador vorticial	N. P.	N. P.	N. P.
Placas o tubos para PCR	N. P.	N. P.	Estériles
Puntas de pipeta con 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
Ethidium Bromide (bromuro de etidio)	Thermo Fisher Scientific: • Ethidium Bromide (bromuro de etidio) UltraPure™ 10 mg/mL	15585-011	N. P.
Geles de poliacrilamida al 6 %	Thermo Fisher Scientific: • Geles Novex® TBE (6 %, 12 pocillos)	EC62652Box	N. P.
Amortiguador TBE de migración	Thermo Fisher Scientific: • Amortiguador TBE de migración Novex (5X)	LC6675	Diluir a 1:5 antes del uso.
Amortiguador de carga de gel	Thermo Fisher Scientific: • Amortiguador de carga de gel 10X BlueJuice™ • Amortiguador TBE de muestra de alta densidad Novex (5X)	10816-015 LC6678	N. P.

Tabla 4: Materiales necesarios no suministrados

Reactivo/material	Reactivos o material recomendado y proveedores	Número de catálogo	Notas
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.

[1]**Nota:** Este producto está a la venta únicamente para su uso en el Espacio Económico Europeo (EEE). No debe revenderse ni transferirse a otras regiones. Consulte también el Aviso legal en el apartado 15.

7.3. Preparación de los reactivos

- Analice todas las muestras desconocidas usando la Specimen Control Size Ladder 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 de la muestra.
- Analice los controles **positivos**, **negativos** y **sin molde** de cada mezcla maestra.

7.3.1. Póngase los guantes para sacar las mezclas maestras del congelador. Deje que los tubos se descongelen. A continuación, mezcle con el agitador vorticial.

7.3.2. Encienda la campana de extracción o la cabina para PCR y pipetee una parte de cada mezcla maestra a los tubos para microcentrífuga, que deberán estar esterilizados y limpios.

- Volúmenes de las partes = 45 µL por reacción.
- Añada una reacción adicional por cada 15 reacciones para corregir errores de pipeteo.
- Para cada mezcla maestra (excepto para la Specimen Control Size Ladder), el número de reacciones (**n**) es:

n = 2 × núm. 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 [ADN de control policlonal IVS-0000])
+ 1	Control sin molde (agua)
+ 1	Para corregir errores de pipeteo
n = 2 × núm. de muestras + 4	**Total**

- Por lo tanto, el volumen total de la parte para cada mezcla maestra = **n × 45 µL**.
- Para la mezcla maestra Specimen Control Size Ladder (Control de la muestra con marcador de tamaño), el número de reacciones (**m**) es:

m = núm. de muestras	(analice las muestras por duplicado)
+ 1	ADN de control positivo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA [ADN de control policlonal IVS-0000])
+ 1	Control sin molde (agua)
+ 1	Para corregir errores de pipeteo
m = núm. de muestras + 3	**Total**

- Por lo tanto, el volumen total de la parte de la Specimen Control Size Ladder es **m × 45 µL**.

7.3.3. Añada 1,25 unidades (o 0,25 µL a 5 U/µl) de ADN polimerasa Taq por reacción a cada mezcla maestra.

- ADN polimerasa Taq total pipeteada a cada mezcla maestra = **n × 0,25 µL y m × 0,25 µL** para la Specimen Control Size Ladder.
- Mezcle suavemente en el agitador vorticial.

7.3.4. Por cada reacción, vierta 45 µL de la mezcla maestra 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 maestras.

- 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 preparar el reactivo, 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 maestra y **n** de reacciones, mezcle:

n × 45 µL Mezcla maestra

n × 0,25 µL ADN polimerasa Taq

Mezcle suavemente en el agitador vorticial.

Pipetee **45 µL** de la mezcla maestra + la solución de ADN polimerasa en cada pocillo.

Pipetee **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 thermal cycler (termociclador) BioRad MJ Research PTC.

Tabla 5: Condiciones del termociclador

Paso	Temperatura	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. 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 el heterodúplex de los productos de la PCR de la Specimen Control Size Ladder. Omita los pasos comprendidos entre el 7.5.1 y el 7.5.2 y continúe con el paso 7.5.3.

7.5.1. Desnaturalice 20 µL de los productos de la PCR a 94°C durante 5 minutos.

7.5.2. Enfríe rápidamente para recocer los productos de la 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 amortiguador de migración TBE 1X.

7.5.4. Mezcle 20 µL de cada muestra con 5 µL del amortiguador 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 análisis pueden adaptarse en consecuencia.

7.5.7. Tiña los geles en 0,5 µg/mL de ethidium bromide (bromuro de etidio) (en agua o amortiguador TBE 0,5X) durante 5-10 minutos.

7.5.8. Destiña los geles en agua durante 5-10 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 pueden desarrollarse una sola vez cada vez que se realiza la prueba, a fin de garantizar la realización adecuada. También debe desarrollarse un control sin molde (p. ej., agua) para saber si la mezcla maestra se ha contaminado y si existe contaminación cruzada en las reacciones. Por otro lado, debe incluirse un control de la solución amortiguadora para garantizar que la solución amortiguadora no esté contaminada. 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 6: Controles positivos recomendados

Mezcla maestra	Diana	ADN de control	Número de catálogo	Tamaño del producto en pares de bases (pb)
***TCRG* Tube A**	Vγ1-8, Vγ10 + varias regiones Jγ	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40881210	**145-255** 211 (Vγ1-8 + Jγ1.3/2.3)
***TCRG* Tube B**	Vγ9, Vγ11 + varias regiones Jγ	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40881210	**80-220** 167 (Vγ9 + Jγ1.3/2.3)
Specimen Control Size Ladder	Varios genes	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	**100, 200, 300, 400, 600[a]** 100, 200, 300, 400, 600[a]

[a]**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. Se determinó el intervalo de tamaños para las mezclas maestras 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 válidos para cada una de las mezclas maestras.

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 desarrolladas por duplicado arrojan resultados incompatibles, realice un nuevo análisis o una nueva evaluación de las muestras.

8.1.4. Deben examinarse todos los controles 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 7: 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 sin molde	Ausencia de amplificación: continúe con el análisis.	Presencia de amplificación: repita la prueba.
Control policlonal	El tamaño de producto se ajusta al tamaño previsto en el apartado 10.1, *Tamaño previsto de los productos amplificados*. Ausencia de reordenamientos clonales. Continúe con el análisis.	Presencia de reordenamientos clonales. Repita la prueba.
Control positivo (puede usarse un control de la extracción si el material de referencia positivo abarca procesos de extracción)	El tamaño de producto se ajusta al tamaño previsto en el apartado 10.1, *Tamaño previsto de los productos amplificados*. Continúe con el análisis.	Repita la prueba.
Specimen Control Size Ladder (este control de amplificación es fundamental para muestras de cantidad y calidad desconocidas)	Si se observan picos de 100, 200, 300, 400 y 600 pb, continúe con el análisis. Dado 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 esté completamente ausente. Continúe con el análisis.	Si no se observan bandas, repita la prueba, 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 la muestra

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[a] que se ajusten al intervalo de tamaños válidos, debe notificarse lo siguiente:

- **"Positivo para la detección de reordenamientos del gen de la cadena gamma del receptor de linfocitos T clonales coherentes con la presencia de una población de células clonales. De acuerdo con los criterios diagnósticos generales, las poblaciones de células clonales pueden ser indicativas de la presencia de neoplasias hemáticas".**

8.2.2. Si no se observan bandas positivas[a] que se ajusten al intervalo de tamaños válidos, debe notificarse lo siguiente:

- **"Negativo para la detección de reordenamientos del gen de la cadena gamma del receptor de linfocitos T clonales".**

[a]**Nota**: Los criterios para definir una banda positiva son los siguientes:

- Los productos que se generen a partir de las muestras que se ajusten al intervalo de tamaños válidos y den lugar a bandas discretas distinguibles de cualquier extensión del fondo son coherentes con una banda positiva.

9. Limitaciones del procedimiento

- Esta prueba no identifica el 100 % de las poblaciones de células clonales.
- La prueba no detecta 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 por 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 8: Controles positivos recomendados

Mezcla maestra	Diana	ADN de control	Número de catálogo	Tamaño del producto en pares de bases (pb)
***TCRG* Tube A**	Vγ1-8, Vγ10 + varias regiones Jγ	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40920010 ' 40880490 40881210	**145-255** 30-255 (Vγ1-8 + Jγ1.1/2.1) 195-230 (Vγ1-8 + Jγ1.3/2.3) 175-195 (Vγ10 + Jγ1.1/2.1) 145-175 (Vγ10 + Jγ1.3/2.3) 212 (Vγ1-8 + Jγ1.3/2.3) 211 (Vγ1-8 + Jγ1.3/2.3)
***TCRG* Tube B**	Vγ9, Vγ11 + varias regiones Jγ	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880490 40881210	**80-220** 195-220 (Vγ9 + Jγ1.1/2.1), 160-195[a] (Vγ9 + Jγ1.3/2.3), 110-140[b] (Vγ11 + Jγ1.1/2.1), 80-110[b] (Vγ11 + Jγ1.3/2.3) 115[c] (Vγ11 + Jγ1.3/2.3) 167 (Vγ9 + Jγ1.3/2.3)
Specimen Control Size Ladder	Varios genes	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA (	--- 40920010	**100, 200, 300, 400, 600[a]** 100, 200, 300, 400, 600[a]

[a]**Nota:** No suelen observarse amplicones en este intervalo de tamaños.
[b]**Nota:** No suelen observarse amplicones en este intervalo de tamaños. Se trata de un repertorio extremadamente restringido.
[c]**Nota:** Este podría representar a un amplicón débil.
[d]**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 a continuación se generaron utilizando las mezclas maestras indicadas. Los productos amplificados se sometieron a un análisis de heterodúplex y se procesaron en gel de poliacrilamida al 6 %.

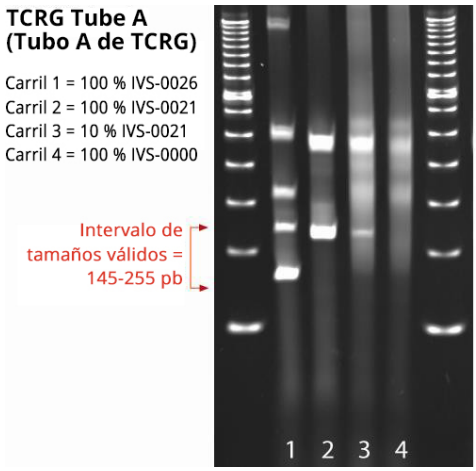


Figura 2. Mezcla maestra *TCRG Tube A* (Tubo A de *TCRG*).

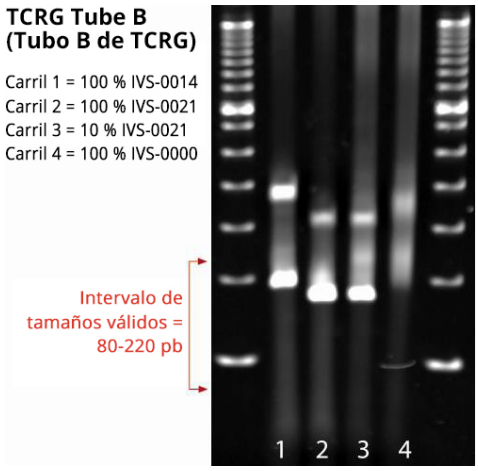


Figura 3. Mezcla maestra *TCRG Tube B* (Tubo B de *TCRG*).

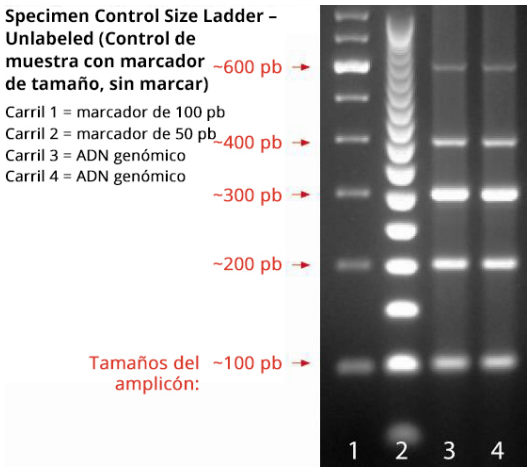


Figura 4. Mezcla maestra Specimen Control Size Ladder (Control de la muestra con marcador de tamaño)

11. Eficacia diagnóstica

La *TCRG* Gene Clonality IdentiClone 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 trastornos linfoproliferativos. 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.[2]

Tabla 9. 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 eficacia diagnóstica de esta prueba es al menos del 89 %. No se generaron resultados positivos falsos claros con las pruebas IdentiClone y se logró un elevado grado de precisión. Además, un beneficio evidente de esta prueba es que los resultados permitieron la detección posterior de reordenamientos génicos específicos en los pacientes y en los tumores por lo que respecta a la detección de enfermedad mínima residual.

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.
3. Van Krieken, J. H. J. M., *et al.*: Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007, **21(2)**:201-206.

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, Building 1
San Diego, CA 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 09:00 a 17:00 CET/CEST

14. Símbolos

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

IVD	Para uso diagnóstico *in vitro*		Fecha de caducidad
REF	Número de catálogo	EC REP	Representante autorizado en la Comunidad Europea
VOL	Volumen de reactivo		Fabricante
LOT	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 sin molde 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. 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®.

© 2020 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 dueños.

15.3. Aviso para el comprador: SOLO para 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 otras regiones. 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 aparte 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 aparte 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).