IdentiClone®

Instrucciones de uso

IdentiClone® *TCRG* Gene Clonality Assay

CE UKCA 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 entre 2°C y 8°C)

Núm. de catálogo	Productos	Cantidad
REF 92070021	IdentiClone *TCRG* Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reactions
REF 92070041	IdentiClone *TCRG* Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reactions

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 mediante fluorescencia diferencial 4
4. REACTIVOS 5
   4.1. Componentes del reactivo 5
   4.2. Advertencias y precauciones 6
   4.3. Conservación y manipulación 6
5. INSTRUMENTAL 7
   5.1. Termociclador 7
   5.2. Instrumental de electroforesis capilar ABI 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. Conservación 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 12
   7.5. Detección por fluorescencia ABI 12
   7.6. Control de calidad 13
   7.7. Controles positivos recomendados 13
8. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS 14
   8.1. Análisis 14
   8.2. Interpretación de la muestra 14
9. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO 15
10. VALORES PREVISTOS 15
   10.1. Tamaño previsto de los productos amplificados 15
   10.2. Datos de la muestra 16
11. EFICACIA DIAGNÓSTICA 17
12. BIBLIOGRAFÍA 17
13. SERVICIO TÉCNICO Y ATENCIÓN AL CLIENTE 17
14. SÍMBOLOS 18
15. AVISO LEGAL 18
   15.1. Garantía y responsabilidad 18
   15.2. Patentes y marcas registradas 18

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 estandarizadas se han optimizado minuciosamente mediante el análisis de muestras de control positivo y negativo con distintas mezclas de reacción. Tras el desarrollo de la prueba se completó una importante fase de validación, que incluyó el análisis de más de 400 muestras clínicas de acuerdo con la clasificación Revised European/American Lymphoma (REAL). Este análisis se realizó en más de treinta conocidos centros de análisis de toda Europa, como parte de un estudio colaborativo denominado BIOMED-2 Concerted Action.[2]

Las pruebas de detección mediante ABI no detectan de forma fiable aquellas poblaciones clonales que representan menos del 1 % 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

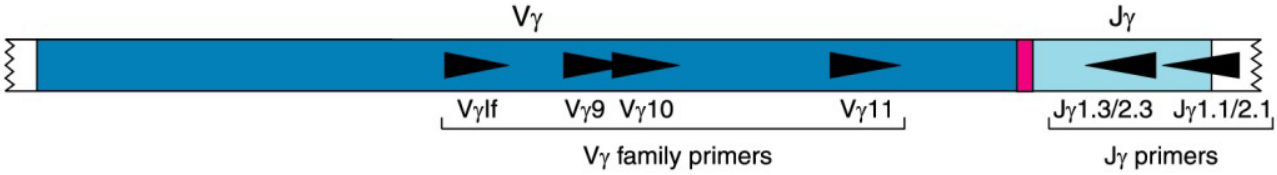
Este kit de prueba incluye tres (3) mezclas maestras. La mezcla maestra *TCRG* Tube A (Tubo A de *TCRG*) contiene una serie de cebadores que se dirige a los genes Vγ1-8 + Vγ10 y a los genes Jγ1.1, Jγ1.3, Jγ2.1 y Jγ2.3 (también conocidos como JγP1, Jγ1, JγP2 y Jγ2, respectivamente). La mezcla maestra *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 96, 197, 297, 397 y 602 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: Vγ1-8 and Vγ10 + Jγ1.1/2 and Jγ1.3/2.3**
***TCRG* Tube B: Vγ9 and Vγ11 + Jγ1.1/2 and 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. Los reordenamientos clonales se identifican como productos prominentes de un solo tamaño en un fondo de amplicones de distintos tamaños que forman una distribución de Gauss en torno a un reordenamiento estadísticamente favorecido de tamaño medio.

3.2. Detección mediante fluorescencia diferencial

La detección mediante fluorescencia diferencial suele utilizarse para resolver amplicones de distintos tamaños a través de un instrumento de electroforesis capilar. Los cebadores se conjugan con distintos colorantes fluorescentes (fluoróforos), de modo que puedan producir espectros de emisión tras su excitación con láser en el instrumento de electroforesis capilar. De este modo, cada colorante fluorescente se corresponde con una región de interés. Este sistema de detección da lugar a una gran sensibilidad, a la resolución de un solo nucleótido, a la detección diferencial de los productos y a la cuantificación relativa. Por otro lado, prácticamente se elimina el uso de geles de agarosa y poliacrilamida, así como de productos cancerígenos, como el bromuro de etidio. Además, la detección diferencial da lugar a una interpretación precisa, reproducible y objetiva de los productos específicos del cebador y el archivado automático de los datos. La reproducibilidad interanalítica e intranalítica de determinación del tamaño mediante electroforesis capilar es de aproximadamente 1-2 pares de bases. La reproducibilidad y la sensibilidad, unidas al archivado automático de los datos de las muestras, permiten la supervisión, el seguimiento y la comparación de los datos de pacientes individuales en el tiempo.

4. Reactivos

4.1. Componentes del reactivo

Tabla 1: Pruebas disponibles

Número de catálogo	Descripción	Cantidad
REF 92070021	IdentiClone *TCRG* Gene Clonality Assay – Gel Detection	33 reacciones
REF 92070041	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	92070021 Número de unidades	92070041 Número de unidades	Temp. de conservación
Mezclas de reacción	22070031CE	*TCRG* Tube A – 6FAM & HEX (Tubo A de *TCRG* - 6FAM y HEX) 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 -65°C
	22070041CE	*TCRG* Tube B – 6FAM & HEX (Tubo B de *TCRG* – 6FAM y HEX) 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 de reacción de control de amplificación de molde	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM (Control de la muestra con marcador de tamaño - 6FAM) Distintos oligonucleótidos dirigidos a los 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 8°C o -85°C -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 prueba 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. Emplee agua para uso en biología molecular a la hora de preparar el ADN de la muestra.
- Dado que se trata de una prueba de sensibilidad analítica, debe ser extremadamente cauteloso para evitar la contaminación de los reactivos o mezclas de amplificación con muestras, controles o material amplificado. Todos los reactivos deben controlarse estrechamente para detectar signos de contaminación (*p. ej.,* controles negativos que den señales positivas). Elimine cualquier reactivo que pueda haberse contaminado.
- Para reducir al mínimo la contaminación, use guantes limpios cuando manipule muestras y reactivos y limpie de manera regular las zonas de trabajo y las pipetas antes de realizar pruebas por PCR.
- El autoclave no elimina la contaminación del ADN. En el laboratorio de PCR, siga una secuencia de trabajo unidireccional entre las distintas zonas de trabajo: comience con la preparación de mezclas de reacción, continúe con la preparación de las muestras, luego con la amplificación y, finalmente, con la detección. No lleve ADN amplificado a las zonas designadas para la preparación de mezclas de reacción o de muestras.
- Las pipetas, puntas de pipetas y cualquier otro instrumento utilizado en una zona específica del laboratorio deben ser de uso exclusivo de dicha zona.
- Siempre que sea posible, utilice material plástico estéril desechable para evitar la contaminación con RNasa y DNasa o la contaminación cruzada.

4.3. Conservación y manipulación

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

5. Instrumental

5.1. Termociclador

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

5.2. Instrumental de electroforesis capilar ABI

- Uso o función: detección y análisis de fragmentos
- Eficacia diagnóstica y especificación:
  - Los siguientes instrumentos de electroforesis capilar se ajustan a las necesidades diagnósticas de la prueba:
    - ABI 310 Genetic Analyzer (1-capillary) (ABI 310: analizador genético [1 capilar])
    - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4-capillaries) (ABI 3100: analizador genético Avant [4 capilares])
    - ABI 3100 Genetic Analyzer (16-capillaries) (ABI 3100: analizador genético [16 capilares])
    - ABI 3130 Genetic Analyzer (4-capillaries) (ABI 3130: analizador genético [4 capilares])
    - ABI 3130xL Genetic Analyzer (16-capillaries) (ABI 3130xL: analizador genético [16 capilares])
    - ABI 3500 Genetic Analyzer (8-capillaries) (ABI 3500: analizador genético [8 capilares])
    - ABI 3500xL Genetic Analyzer (24-capillaries) (ABI 3500xL: analizador genético [24 capilares])
- Siga las instrucciones de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante.
- El instrumento ABI debe calibrarse usando las Matrix Standards (soluciones patrón de la matriz) que corresponda de acuerdo con el apartado *7.2, Materiales necesarios (no suministrados)*.
- Utilice los ajustes predeterminados para el tipo de polímero y capilar.
- Consulte el apartado *7.5, Detección por fluorescencia ABI,* para conocer las instrucciones de preparación de la muestra.

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 ADNg de las muestras de los pacientes lo antes posible. Vuelva a suspender el ADN en concentraciones finales de entre 100 µg y 400 µg por mL en solución TE 1/10 (1 mM de Tris-HCl, pH 8,0 y 0,1 mM de EDTA) o en agua 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, no suele ser necesario cuantificar y ajustar las concentraciones de ADN. 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. Conservación 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 22070031CE	*TCRG* Tube A – 6FAM & HEX (Tubo A de *TCRG* - 6FAM y HEX)
REF 22070041CE	*TCRG* Tube B – 6FAM & HEX (Tubo B de *TCRG* - 6FAM y HEX)
REF 20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM (Control de la muestra con marcador de tamaño - 6FAM)
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 proveedor	N.º de catálogo (REF)	Notas
ADN polimerasa	Roche: • DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq Invivoscribe, Inc.: • DNA Polymerase FalconTaq o equivalente	05206944190 60970130	N. P.
Agua para uso en biología molecular o que reúna las condiciones de la USP desionizada y destilada en vidrio	N. P.	N. P.	Estéril y exenta de DNasa y RNasa.
Pipetas calibradas	Rainin: • Pipetas P-2, P-20, P-200 y P-1000 • O pipetas SL-2, SL-20, SL-200 y SL-1000	N. P.	Deben ser capaces de medir con precisión volúmenes de entre 1 µL y 1000 µL.
Thermal cycler (termociclador)	Bio-Rad: • MJ Research PTC-100 o PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer: • PE 9600 o PE 9700	N. P.	N. P.
Agitador vortex	N. P.	N. P.	N. P.
Placas o tubos para PCR	N. P.	N. P.	Estériles
Puntas de pipeta con barrera de filtro	N. P.	N. P.	Estériles y exentas de RNasa, DNasa y pirógenos
Tubos de microcentrífuga	N. P.	N. P.	Estériles
Instrumento de electroforesis capilar ABI	Thermo Fisher scientific: • ABI 310, 3100 o 3500 series	N. P.	N. P.
Hi-Di Formamide (Formamida Hi-Di)	Thermo Fisher Scientific: • Formamide (Formamida) Hi-Di™	4311320	N. P.

Tabla 4: Materiales necesarios (no suministrados)

Reactivo/material	Reactivos o material recomendado y proveedor	N.º de catálogo (REF)	Notas

Patrones de tamaño	Invivoscribe, Inc.:
	• Hi-Di Formamide con patrones de tamaño ROX para ABI 310
	• Hi-Di Formamide con patrones de tamaño ROX para ABI 3100
	Thermo Fisher Scientific:
	• Para ABI 3100 o 3130 instruments:
	  ○ GeneScan™ - 400HD [ROX]™
	• Para ABI 3500 instruments:
	  ○ GeneScan™ - 600 [LIZ]™ v2.0
		60980051
		60980061
		402985
		4408399
			N. P.

Colorantes para calibración espectral	Thermo Fisher Scientific:
	• Para ABI 3100 y 3130 instruments:
	  ○ DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D) [Kit de soluciones patrón de la matriz DS-30 (Colorantes D)]
	• Para ABI 310 instruments:
	  ○ NED Matrix Standard
	  ○ Y Fluorescent Amidite Matrix Standards (Soluciones patrón de la matriz fluorescente amidite) [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX]
	• Para ABI 3500 instruments:
	  ○ DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) [Kit de soluciones patrón de la matriz DS-33 (Colorantes G5)]
		4345827
		402996
		401546
		4345833
			N. P.

Polymer (Polímero)	Thermo Fisher Scientific:
	• POP-4™ Polymer:
	  ○ POP-4 para 310 Genetic Analyzers
	  ○ POP-4 para 3100/3100-Avant Genetic Analyzers
	  ○ POP-4 para 3130/3130xL Genetic Analyzers
	• POP-7™ Polymer:
	  ○ POP-7 para 3130/3130xL Genetic Analyzers
	  ○ POP-7 para 3500/3500xL Genetic Analyzers
		402838
		4316355
		4352755
		4352759
		4393714
			N. P.

Solución amortiguadora	Thermo Fisher Scientifics: • 10X Genetic Analyzer Buffer with EDTA (Solución amortiguadora de analizador genético con EDTA 10X)	402824	N. P.

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 de reacción 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 de reacción 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 × n.º de muestras	(analice las muestras por duplicado)
+ 1	ADN de control positivo (consulte el apartado *7.7, Controles positivos recomendados*)
+ 1	ADN de control negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	Control sin molde (agua)
+ 1	Para corregir errores de pipeteo
n = 2 × n.º de muestras + 4	**Total**

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

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

- La ADN polimerasa Taq total pipeteada a cada mezcla de reacción es **n × 0,25 µL** y **m × 0,25 µL** para la Specimen Control Size Ladder Master Mix.
- Mezcle suavemente en el agitador vortex.

7.3.4. Por cada reacción, vierta 45 µL de la mezcla de reacción que corresponda + la solución de ADN polimerasa en los pocillos de una placa o un tubo para PCR.

7.3.5. Añada 5 µL del molde que corresponda (ADN de muestra, ADN de control positivo, ADN de control negativo o agua) a los pocillos individuales que contengan las mezclas de reacción respectivas.

- Pipetee arriba y abajo varias veces para mezclar.

7.3.6. Tape o cubra la placa para PCR.

- Las muestras estarán listas para su amplificación en un termociclador.
- Si la amplificación no puede realizarse inmediatamente después de 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 de reacción y **n** de reacciones, mezcle:

n × 45 µL	Mezcla de reacción
n × 0,25 µL	ADN polimerasa Taq

Mezcle suavemente en el agitador vorticial.

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

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 los termocicladores 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 la 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 por fluorescencia ABI

- Tenga en cuenta que la detección por fluorescencia ABI suele generar un pico precedente que es un artefacto debido al método de detección que utiliza la plataforma ABI. Los picos precedentes suelen ser asimétricos; la base suele inclinarse en el lado derecho hacia el pico real. Esto es especialmente evidente en el caso de la mezcla de reacción Specimen Control Size Ladder, con un pico de 84 nucleótidos precedente al pico real, de 96 nucleótidos.
- Evite la multiplicación de productos de PCR procedentes de diferentes mezclas de reacción, pues esta dará lugar a una menor sensibilidad general.

Plataformas ABI 310, 3100 O 3130

7.5.1. Mezcle, en un tubo para microcentrífuga nuevo, la cantidad pertinente (para un total de 10 µL por reacción) de Hi-Di Formamide con los patrones de tamaño ROX. Mezcle bien en el agitador vorticial.

7.5.2. En una placa de 96 pocillos para PCR nueva, vierta 10 µL de la mezcla de Hi-Di Formamide y los patrones de tamaño ROX en un pocillo por reacción.

7.5.3. Pipetee 1 µL de cada reacción PCR a los pocillos que contienen la mezcla de Hi-Di Formamide y los patrones de tamaño ROX.

- Pipetee una muestra por pocillo.
- Pipetee arriba y abajo para mezclar.

7.5.4. Tape o cubra la placa o tubos para PCR.

7.5.5. Desnaturalice las muestras a 95°C durante 2 minutos; a continuación, enfríelas en hielo durante 5 minutos.

7.5.6. Prepare una **hoja de muestras** y una **lista de inyección** para las muestras.

7.5.7. Desarrolle las muestras en un equipo de electroforesis capilar ABI de acuerdo con el manual del usuario.

- Los datos se muestran automáticamente en forma de picos específicos en tamaño y color.

7.5.8. Revise el perfil y los controles y notifique los resultados. (Consulte los apartados 8, Interpretación de los resultados, y 10, Valores previstos, a continuación).

Plataformas ABI 3500:

Nota: Habida cuenta de las variaciones entre instrumentos por lo que respecta al rendimiento de la plataforma ABI 3500, las cantidades de formamida, muestra y patrón de tamaño que se recogen en el protocolo son puramente indicativas. Es posible que se deba optimizar el protocolo para las plataformas ABI 3500.

7.5.9. Mezcle, en un tubo para microcentrífuga nuevo, la cantidad pertinente (9,5 µL por reacción) de Hi-Di Formamide (formamida Hi-Di) con los patrones de tamaño LIZ. Mezcle bien en el agitador vorticial.

7.5.10. En una placa de 96 pocillos para PCR nueva, vierta 9,5 µL de la mezcla de Hi-Di Formamide (formamida Hi-Di) y los patrones de tamaño LIZ en un pocillo por reacción.

7.5.11. Transfer 0.5 µL of each PCR product to the wells containing Hi-Di Formamide with LIZ size standards.

- Pipetee una muestra por pocillo.
- Pipetee arriba y abajo para mezclar.

7.5.12. Tape o cubra la placa para PCR.

7.5.13. Desnaturalice las muestras a 95°C durante 3 minutos; a continuación, enfríelas en hielo durante 5 minutos.

7.5.14. Prepare una **hoja de muestras** y una **lista de inyección** para las muestras.

7.5.15. Desarrolle las muestras en un equipo de electroforesis capilar ABI 3500 de acuerdo con el manual del usuario.

- Los datos se muestran de forma automática como picos de tamaños y colores específicos.

7.5.16. Revise el perfil y los controles y notifique los resultados. 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 de reacción se ha contaminado y si existe contaminación cruzada en las reacciones de la PCR por el uso de técnicas inadecuadas. 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. Los tamaños del amplicón observados con cada instrumento de electroforesis capilar pueden diferir en 1-4 nucleótidos (nt) de los indicados, en función de la plataforma de detección y de la versión del software de análisis utilizado. Una vez identificado, el tamaño del amplicón determinado en el instrumento específico será coherente entre desarrollos. La reproducibilidad es extremadamente útil para el control de las recidivas.

Nota: Con "color", se hace referencia al color de los productos generados con la mezcla de reacción cuando se utiliza la asignación de color por defecto en los sistemas de detección por fluorescencia ABI.

Tabla 6: Controles positivos recomendados

Mezcla de reacción	Diana	Color	ADN de control	Número de catálogo	Product Size in base pair (bp)
TCRG Tube A	Vγ1-8, + Vγ10 + varias regiones Jγ	Blue + Green	**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	Blue + Green	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40881210	**80-220** **167** (Vγ9 + Jγ1.3/2.3)
Specimen Control Size Ladder	Distintos genes	Azul	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	**96, 197, 297, 397, 602[a]** 96, 197, 297, 397, 602[a]

[a]Nota: Dado que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 602 pb presente una menor señal o esté completamente ausente.

8. Interpretación de los resultados

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

8.1. Análisis

8.1.1. Indique lo siguiente para las muestras que no consiga amplificar tras repetir el análisis: "No se puede notificar un resultado para esta 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 del producto es coherente con el 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 el ensayo.
Control positivo (puede usarse un control de la extracción si el material de referencia positivo abarca procesos de extracción)	El tamaño del producto es coherente con el tamaño previsto en el apartado 10.1: *Tamaño previsto de los productos amplificados*. Continúe con el análisis.	Repita la prueba.
Specimen Control Size Ladder (Control de la muestra con marcador de tamaño) (este control de amplificación es esencial para muestras cuya cantidad y calidad se desconoce)	Si se observan picos de 96, 197, 297, 397 y 602 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 602 pb tenga una menor señal o que 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 uno o dos picos positivos prominentes[a] que se ajustan al intervalo de tamaños válidos, debe notificarse lo siguiente:

- "**Positive for the detection of clonal T-cell receptor gamma chain gene rearrangement(s) consistent with the presence of a clonal cell population. 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 picos positivos[a] que se ajusten al intervalo de tamaños válidos, debe notificarse lo siguiente:

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

[a]Nota: Los criterios para definir un pico positivo son los siguientes:

8.2.3. Para ser coherentes con un pico positivo, los productos generados a partir de **muestras de diagnóstico** cumplen con todos los siguientes requisitos:

- estar dentro del rango de tamaño válido; y,
- ser al menos tres veces la amplitud del tercer pico más grande en la misma distribución policlonal de fondo que el producto.[b]

8.2.4. Los productos generados a partir de **muestras recogidas tras el diagnóstico inicial** que se ajustan al intervalo de tamaños válidos y

- al menos tres veces la amplitud del tercer pico más grande en la misma distribución policlonal de fondo que el producto;[b] **O**,
- superan la amplitud de los picos vecinos adyacentes y son idénticos en tamaño a los productos de amplicones clonales generados previamente a partir del mismo paciente utilizando la misma mezcla maestra

[b]Nota: Si el producto no cae en una distribución de fondo policlonal, el tercer pico más alto puede provenir de la distribución de fondo policlonal más cercana al producto.

9. Limitaciones del procedimiento

- Esta prueba no identifica el 100 % de las poblaciones de células clonales.
- Esta prueba no es capaz de detectar de manera fiable menos de una (1) célula positiva por cada 100 células normales.
- Interpret the results of molecular clonality tests in the context of clinical, histological and immunophenotypic data.
- 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. Los tamaños del amplicón observados con cada instrumento de electroforesis capilar pueden diferir en 1-4 nucleótidos (nt) de los indicados, en función de la plataforma de detección y de la versión del software de análisis utilizado. Una vez identificado, el tamaño del amplicón determinado en la plataforma específica será coherente entre desarrollos. La reproducibilidad es extremadamente útil para el control de las recidivas.

Nota: Con "color", se hace referencia al color de los productos generados con la mezcla de reacción cuando se utiliza la asignación de color por defecto en los sistemas de detección por fluorescencia ABI.

Tabla 8: Tamaño previsto de los productos amplificados

Mezcla de reacción	Diana	Color	ADN de control	Número de catálogo	Product Size in base pair (bp)
TCRG Tube A	Vγ1-8, + Vγ10 + multiple Jγ regions	Blue + Green	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880490 40881210	**145-255** 230 - 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 + multiple Jv regions	Blue + Green	**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	Distintos genes	Azul	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	**96, 197, 297, 397, 602[b]** 96, 197, 297, 397, 602[b]

[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 602 pb presente una menor señal o esté completamente ausente.

10.2. Datos de la muestra

The data shown below were generated using the indicated master mixes. Los productos amplificados se desarrollaron en un instrumento ABI.

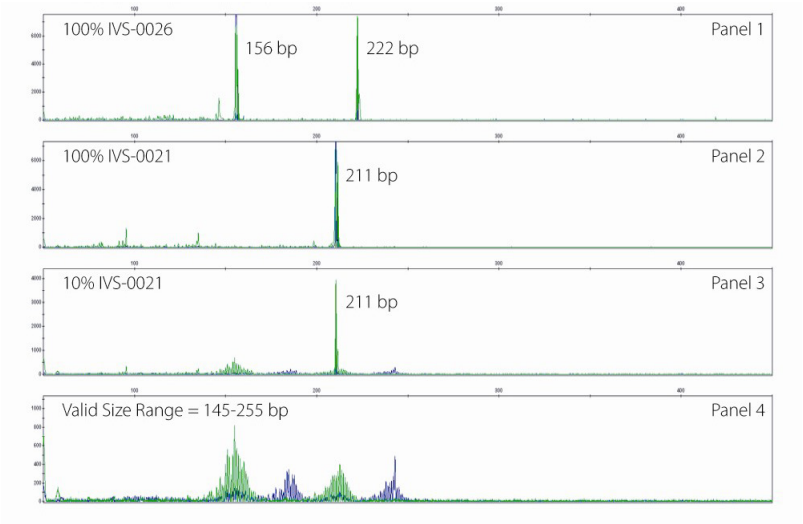


Figura 2. *TCRG* Tube A – 6FAM & HEX master mix.

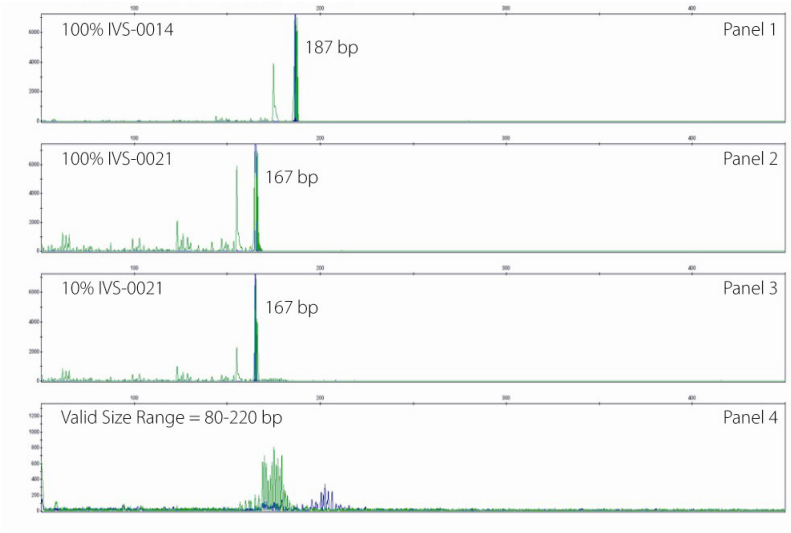


Figura 3. *TCRG* Tube B – 6FAM & HEX master mix.

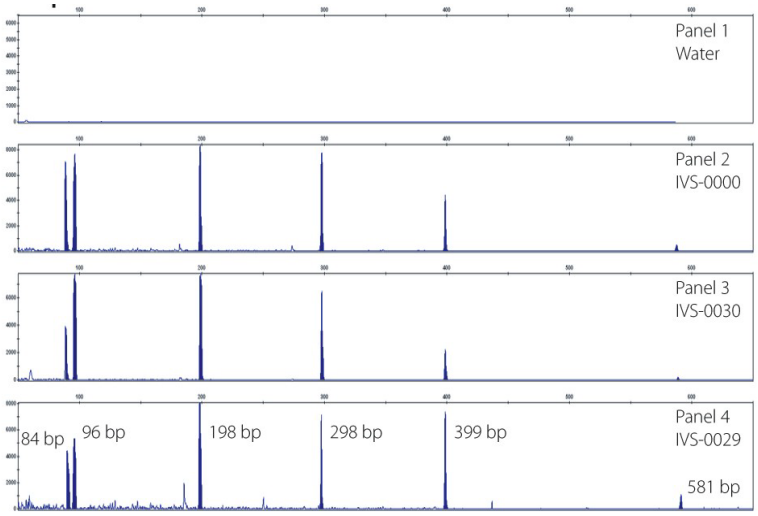


Figura 4. Specimen Control Size Ladder – 6FAM master mix.

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 precisión diagnóstica determinada de este ensayo IdentiClone es al menos del 89 %. No se generaron falsos positivos claros con los ensayos IdentiClone y se logró un elevado grado de precisión. Además, un beneficio evidente de esta prueba es que los resultados permitieron la detección posterior de reordenamientos génicos específicos de paciente y de tumor por lo que respecta a la detección de enfermedad mínima residual.

12. Bibliografía

1. Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. An automated semiquantitative B- and T-cell clonality assay. *Mol. Diag*. 1999, **4(2)**:101-117.
2. van Dongen, JJM *et al*. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003, **17(12)**:2257-2317.
3. van Krieken, JHJM, *et al*. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 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 | California 92121-2711 | Estados Unidos

Téléfono: +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

14. Símbolos

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

REF	Número de Catálogo		Fecha de Caducidad
VOL	Volumen de Reactivo	EC REP	Representante Autorizado en la Comunidad Europea
LOT	Número de Lote		Consulte las instrucciones de uso
	Condiciones de Conservación	IVD	Para uso diagnóstico *in vitro*
UDI	Identificador Único de Dispositivo		Fabricante
UK CA	Conformidad del Reino Unido Evaluada	UKRP	Persona Responsable del Reino Unido
CH REP	Representante Autorizado en Suiza	CE	Conformidad Europea

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, y solicitudes pendientes y futuras relacionadas. Todas estas patentes y solicitudes se limitan únicamente a Invivoscribe®. También son aplicables patentes adicionales cuyo uso se ha autorizado a Invivoscribe. Muchos de estos productos implican el uso de métodos de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante la compra de este producto no se transmite de manera explícita ni implícita ninguna de las licencias de uso de estas patentes sobre enzimas o procesos de amplificación.

IdentiClone® es una marca comercial registrada de Invivoscribe®.

©2023 Invivoscribe, Inc. Todos los derechos reservados. Las marcas comerciales que figuran en este documento son propiedad de Invivoscribe, Inc., de sus filiales o, en el caso de las marcas comerciales de terceros, de sus respectivos propietarios.